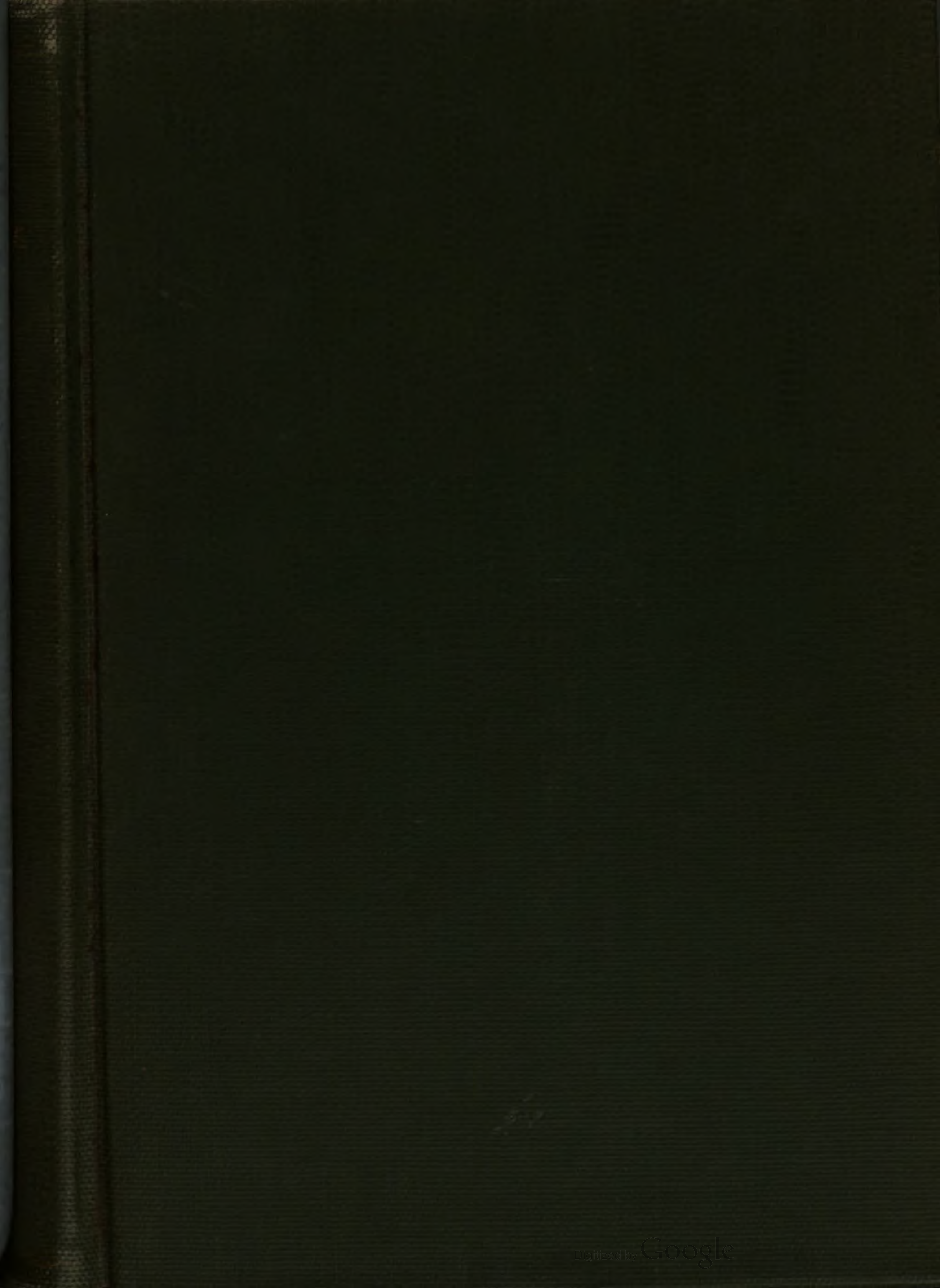
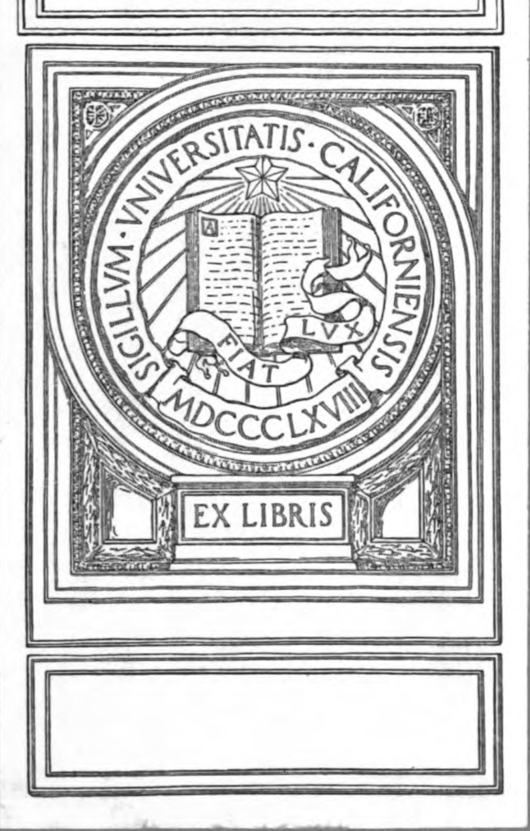
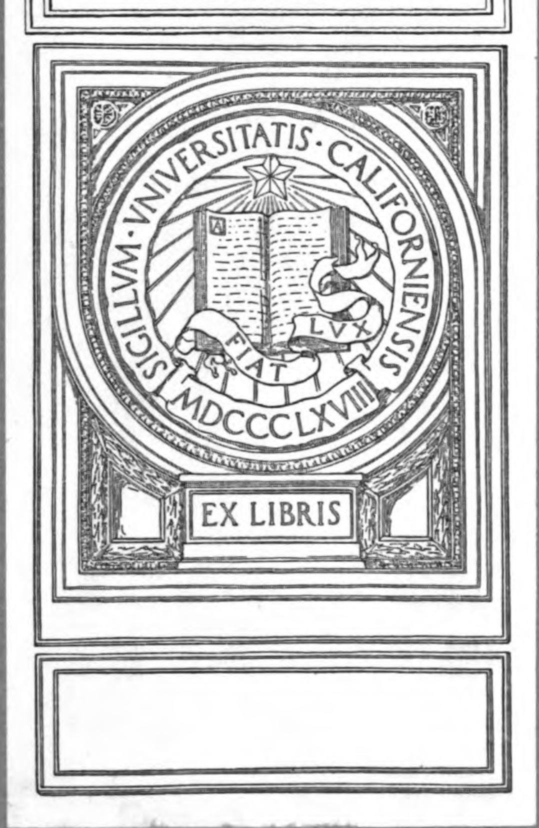
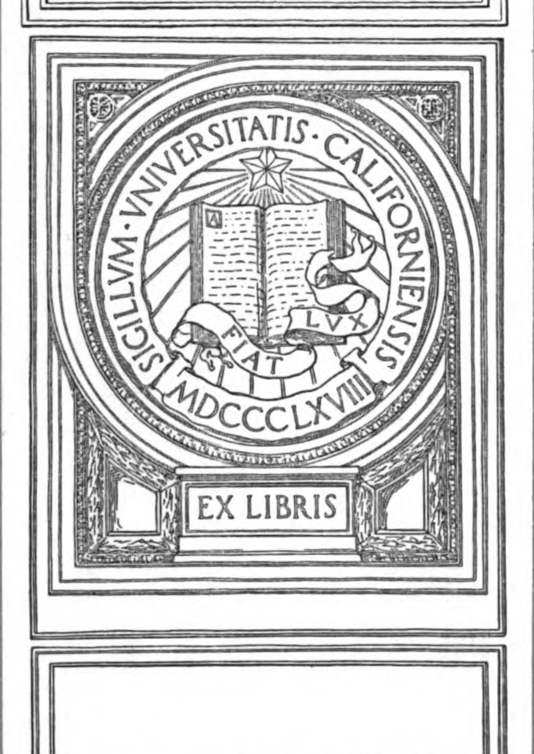




MEDICAL SCHOOL
LIBRARY
SIGILLVM · VNIVERSITATIS · CALIFORNIENSIS
FIAT LVX
MDCCCLXVIII
EX LIBRIS


MEDICAL SCHOOL
LIBRARY
SIGILLVM · VNIVERSITATIS · CALIFORNIENSIS
FIAT LVX
MDCCCLXVIII
EX LIBRIS


MEDICAL SCHOOL
LIBRARY
SIGILLVM · VNIVERSITATIS · CALIFORNIENSIS
FIAT LVX
MDCCCLXVIII
EX LIBRIS



Biochemische Zeitschrift

Unter Mitwirkung von

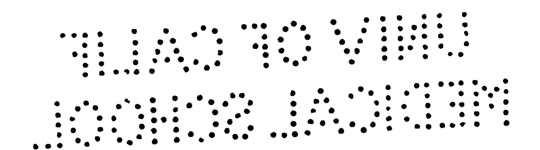
herausgegeben von

C. Neuberg-Berlin

Hundertzweiundachtzigster Band



Berlin
Verlag von Julius Springer
1927



Druck von Friedr. Vieweg & Sohn Akt.-Ges., Braunschweig

Inhalt.



A. BACH

IN

MOSKAU

GEWIDMET

Zur Charakteristik des Stoffwechsels in einzelnen Teilen des Gehirns[1]).

(Versuche mit Explantaten aus dem Gehirn ausgewachsener Tiere.)

Von

A. A. Krontowski.

(Aus der Abteilung für Biologie und experimentelle Medizin des Röntgeninstituts zu Kiew.)

(Eingegangen am 7. Dezember 1926.)

Mit 3 Abbildungen im Text.

I. Einleitung.

Schon die ersten Versuche von *Harrison* selbst (1907 bis 1909) haben gezeigt, daß die Explantation von Stückchen aus embryonalem Nervengewebe mit Erfolg zum Studium einiger wichtiger Fragen betreffend die Entwicklung des Nervensystems angewandt werden kann. Dieser Forscher (2) sowie manche andere Autoren [*Burrows* (1), *Ingebrigtsen* (5), *Levi* (11) u. a.] haben das Auswachsen von Nervenfasern in Gewebskulturen beobachtet und studiert. Da aber die Wachstumserscheinungen (sei es die Teilung von Neuroblasten oder das Auswachsen der Nervenfasern) nur in den Gewebskulturen aus dem embryonalen Nervengewebe oder demjenigen ganz junger Tiere zu beobachten waren, sah man gewöhnlich davon ab, Explantate aus dem zentralen Nervensystem ausgewachsener Tiere zum Studium der oder jener Fragen bezüglich des Nervengewebes anzulegen.

Indessen wäre es, meines Erachtens, vom Gesichtspunkt der normalen und pathologischen Physiologie von besonderem Interesse, mittels der Explantationsmethode *die Lebenstätigkeit einzelner Teile des Gehirns, namentlich bei ausgewachsenen Tieren*, unter verschiedenen Bedingungen zu untersuchen. Im Laufe der letzten Jahre wurden von

[1]) Vorgetragen in der Sitzung der Kiewer Pathologen-Gesellschaft am 16. Mai 1926 und (mit Berücksichtigung weiterer Versuche über Insulinwirkung) auf der Allrussischen Physiologentagung zu Leningrad am 27. Mai 1926.



mir und meinen Mitarbeitern [*Krontowski* (7), *Krontowski* und *Bronstein* (8), *Krontowski, Jazimirska-Krontowska* und *Magath* (9), *Krontowski, Bereschanski* und *Majewski* (10)] einige physikalisch-chemische und mikrochemische Methoden zum Studium der Lebenstätigkeit explantierter Gewebe angewandt; es hat sich ergeben, daß es auf solche Weise gelingt, bestimmte Kriterien zur Abschätzung der Lebenserscheinungen in Gewebskulturen — vor allem des Stoffwechsels — zu gewinnen, und zwar sogar in den Fällen, wo das explantierte Gewebsstückchen (z. B. ein Stückchen Nierenrindensubstanz eines ausgewachsenen Tieres) keine Wachstumserscheinungen aufweist. Diese Feststellungen regten mich an, den Versuch zu unternehmen, *entsprechende Explantate aus bestimmten Teilen des Gehirns ausgewachsener Tiere anzulegen und den Stoffwechsel dieser Explantate, soweit es möglich, physikalisch-chemisch und mikrochemisch zu verfolgen.*

Auf diese Weise hoffte ich zu einigen Resultaten zu gelangen, indem ich vermutete, daß die Nervengewebestückchen bei der Explantation in einem passenden Medium sich doch unter etwas *besseren Bedingungen* (schwerlich unter schlechteren) befinden werden, als das Nervengewebe in den Versuchen von *Hirschberg* und *Winterstein* (3), die das einem Frosche entnommene Rückenmark einfach in Kochsalzlösung (unter Sauerstoffversorgung) mit Zuckerzusatz versenkten und den Zuckerverbrauch abschätzten, oder in den Versuchen von *Warburg, Posener* und *Negelein* (14), die, unter anderen Versuchen nach der eleganten *Warburg*schen Methode, auch Schnitte aus der grauen Gehirnsubstanz der Ratte in Ringerlösung mit Glucose unterbrachten und die Glykolyse gasometrisch bestimmten. Indessen haben die Versuche von *Hirschberg* und *Winterstein* eine Reihe äußerst interessanter Feststellungen zur Charakteristik des Stoffwechsels im zentralen Nervensystem erbracht [vgl. auch *Hirschberg* und *Winterstein* (4)], während die Versuche von *Warburg* und seinen Mitarbeitern das Vorhandensein einer energischen anaeroben Glykolyse in der Gehirnrinde der Ratte zeigten, wobei die Glykolyse derjenigen durch embryonale Gewebe annähernd gleichstand. Die interessanten Ergebnisse der genannten Forscher ließen es hoffen, daß auch meine Versuche, ausgeführt mittels einer anderen Methodik [unter Ausnutzung aller Vorzüge der Explantation[1])] und in einer anderen Richtung, auch nicht erfolglos bleiben werden. Es steht ja fest, daß die Stückchen des Nervengewebes bei der Explantation in solche Bedingungen geraten, unter welchen die Nervenzellen eine Zeitlang am Leben bleiben, wobei auch das Auswachsen von Nervenfasern stattfinden kann, und zwar nicht nur in Fällen, wo die Stückchen dem embryonalen Gewebe angehörten, sondern auch in Explantaten aus demjenigen jüngerer Tiere: so wurden z. B. Stückchen aus Spinalganglien [*Marinesco* und *Minea* (12), *Ingebrigtsen* (5)] oder Kleinhirn [*Ingebrigtsen* (6)] junger Katzen und Meerschweinchen explantiert. Zugunsten der Annahme, daß auch in Explantaten aus der Großhirnrinde ausgewachsener Tiere das Leben der Nervenzellen gewissermaßen erhalten bleibe, sprach auch der Umstand, daß in einigen meiner früheren Versuche,

[1]) Leider sind die gegenwärtigen Explantationsmethoden noch sehr unvollkommen und leiden an manchen Gebrechen.



als ich Stückchen aus der Rinde und anderen Teilen des Gehirns ausgewachsener Tiere unter gleichen Bedingungen explantierte, nicht selten in Kulturen aus einzelnen Gehirnteilen (namentlich aus den phylogenetisch älteren), aus dem zentralen Höhlengrau, Nervenfasern wuchsen, obwohl bei der Besichtigung der lebenden Explantate aus der Rinde sich keine Wachstumserscheinungen seitens der Nervenelemente konstatieren ließen; wenigstens einige von den in der Peripherie des Stückchens gelegenen Nervenzellen blieben also ziemlich lange am Leben.

II. Versuchsmaterial und Methodik.

Um sich zunächst zu überzeugen, ob es tatsächlich gelingt, den Stoffwechsel in Gehirnexplantaten aus ausgewachsenen Tieren wahrzunehmen, wurden einige Versuchsserien an Gewebskulturen aus einzelnen Teilen des Gehirns ausgewachsener Kaninchen unternommen: mittels feiner Instrumente (derjenigen für Augenchirurgie) wurden kleine Stückchen (0,5 bis 0,8 mm Durchmesser) aus der Großhirnrinde (auf der Höhe der großen Pyramidenzellen, was dann an mikroskopischen Präparaten nachgeprüft wurde), aus verschiedenen Teilen der weißen Gehirnsubstanz und aus verschiedenen Punkten des zentralen Höhlengrau ausgeschnitten. Stückchen von möglichst gleichen Dimensionen wurden dann auf übliche Weise in kleineren (gleich großen) Mediumtropfen explantiert. (Zurzeit werden von uns die Dimensionen der Gewebestückchen als auch der Mediumtropfen mittels eines speziellen Instrumentariums genauer dosiert.) Um genauere Resultate zu erzielen, legte ich an einer jeden Gabritschewskischale mehrere zum Grundversuch gehörende und Kontrollkulturen an [als Kontrolle dienten Mediumtropfen mit ebensolchen durch Kochen abgetöteten oder autolysierten (mittels einer vorhergehenden 2 Tage langen aseptischen Aufbewahrung bei 37,5° C) Gehirnstückchen oder ebensolche Mediumtropfen ohne Stückchen]. Die Schalen wurden in Thermostaten bei 37,5° untergebracht. In einigen Fällen wurden die Kulturen in *Carrel*schen Schalen (Modell D) angefertigt; in solchen Kulturen wurde nur der flüssige Teil des Mediums zur Analyse genommen. Als Maß des Stoffwechselverlaufs untersuchte ich in diesen ersten Versuchsserien vor allem den Zuckerverbrauch, da, außer sonstigen Überlegungen [siehe *Krontowski* und *Bronstein* (8)] „der Zucker nicht bloß eine Quelle der Muskelkraft, sondern auch eine solche der Tätigkeit der nervösen Zentralorgane darstellt", wie es *Hirschberg* und *Winterstein* auf Grund ihrer zahlreichen Versuche geschlossen haben (3). Für die Zuckerbestimmung wurden Kulturen im Medium aus gleichen Volumen Plasma und Tyrodelösung angelegt; die Bestimmungen in Explantaten wurden nach der Methode von *Hagedorn-Jensen* ausgeführt, wie es in einer unserer vorhergehenden Arbeiten beschrieben wurde [*Krontowski* und *Bronstein* (8)]. Außerdem wurde die von mir [*Krontowski* (7)] ausgearbeitete Methode angewandt, die im wesentlichen darin besteht, daß man zu dem Medium, in welchem die Gewebe explantiert werden (verdünntes Plasma, *Lewis-Locke*sches Medium und dergleichen) bestimmte Stoffe zugibt (verschiedene Kohlehydrate, Butyrin usw.), welche durch die Lebenstätigkeit der Explantate unter Bildung saurer Produkte abgebaut werden, und daß man im Laufe der Explantation nach bestimmten Zeitintervallen die Wasserstoffzahl (Wasserstoffionenkonzentration) — entweder elektrometrisch mittels Mikroelektrode oder mittels Indikatoren von *Clark* und *Lubs* — bestimmt. Für derartige Untersuchungen wurden die Gehirnstückchen in einer Mischung

von Plasma, Tyrodelösung und Glucose explantiert (um eine raschere Anhäufung der sauren Abbauprodukte und eine deutlichere p_H-Verschiebung zu erzielen, wurde ein Teil Plasma mit 3 Teilen Tyrodelösung verdünnt mit Zusatz von so viel Glucose, daß der Gesamtgehalt des zugesetzten Zuckers 1 Proz. betrug; seltener wurde Plasma + Tyrodelösung āā + Glucose gebraucht), dann wurden die p_H-Werte (im Mediumtropfen und dem explantierten Stückchen) in bestimmten Zeitintervallen mittels der Indikatoren von *Clark* und *Lubs* bestimmt [nach der von *Krontowski* (7) und *Krontowski, Jazimirska-Krontowska* und *Magath* (9) beschriebenen Methodik].

III. Versuche mit Explantaten aus verschiedenen Teilen des Gehirns auswachsener Tiere.

Schon die allerersten Versuche, die ich vor 2 Jahren unternommen habe, ergaben, daß die Explantate aus der grauen Substanz der Gehirnrinde in Anwesenheit von 1 Proz. Glucose sehr rasch[1]) (im Laufe der ersten Versuchsstunden) das Medium beträchtlich ansäuern (dessen p_H-Wert vermindern), so daß gegen das Ende der ersten 24 Stunden die Reaktion deutlich sauer wird (diese Reaktionsverschiebung läßt sich sogar mittels Lackmus als Indikator demonstrieren). Andererseits erzeugen die Explantate aus der weißen Gehirnsubstanz unter analogen Bedingungen keine oder nur eine äußerst geringe Reaktionsänderung im Kulturmedium. Explantate aus dem zentralen Höhlengrau ergaben wechselnde Resultate, abhängig vor allem von der Stelle, der die Stückchen entnommen waren (vom Gehalt der Explantate an Zellen und dergleichen); diese Versuche zeigten aber, daß der Stoffwechsel in den Explantaten aus dem zentralen Höhlengrau bedeutend intensiver war als in denjenigen aus der weißen Gehirnsubstanz, jedoch in der Mehrzahl der Fälle geringer als in Kulturen aus der grauen Substanz der Rinde (manchmal waren auch umgekehrte Verhältnisse zu beobachten). In den Kontrollen — ebensolche Mediumtropfen mit durch Kochen abgetöteten oder autolysierten Stückchen oder Mediumtropfen ohne Stückchen — ließ sich keine derartige Reaktionsverschiebung feststellen.

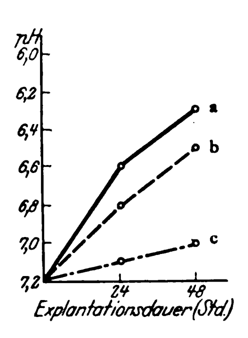


Abb. 1.
Abänderung der [H˙] in Explantaten (in Plasma + Ringerlösung + 1 Proz. Glucose) aus:
a) der grauen Substanz der Großhirnrinde,
b) dem zentralen Höhlengrau,
c) der weißen Substanz des Gehirns eines ausgewachsenen Kaninchens.

Als Beispiel sei eine Kurve der Wasserstoffionenkonzentrationsverschiebung in Explantaten aus verschiedenen Teilen des Gehirns

[1]) Falls das Medium auf oben geschilderte Weise zusammengesetzt wird [*Krontowski* (7)].

eines ausgewachsenen Kaninchens (unter der oben angegebenen Zusammensetzung des Mediums, 1 Teil Plasma + 3 Teile Ringerlösung mit Glucose) angeführt.

Die direkte Abschätzung des Zuckerverbrauchs seitens der Explantate aus verschiedenen Gehirnteilen ausgewachsener Kaninchen führte zu analogen Ergebnissen. Es möge ein kurzer Auszug aus dem Protokoll eines Versuchs angeführt werden (s. Tabelle I).

Tabelle I.

Zuckergehalt und Zuckerverbrauch in 48stündigen Explantaten aus verschiedenen Teilen des Gehirns ausgewachsener Kaninchen.

	Graue Substanz der Gehirnrinde I	Graue Substanz der Gehirnrinde II	Weiße Substanz des Gehirns	Zentrales Höhlengrau I	Zentrales Höhlengrau II	Kontrolle: Mediumtropfen mit getöteten Gewebestückchen
Zahl der Explantate . .	4	5	4	4	4	5
Gesamtgewicht in mg (Medium + Stückchen)	69,5	81	50,5	58,0	46,5	48,5
Zuckergehalt in mg . .	0,042	0,043	0,056	0,049	0,035	0,065
Zuckergehalt in Proz. .	0,06	0,053	0,11	0,08	0,075	0,13
Zuckerverbrauch in Proz. im Vergleich zur Kontrolle (deren Zuckergehalt gleich 100 Proz. gesetzt)	53,8	59,2	15,4	38,5	42,3	0

Aus der angeführten Tabelle ist zu ersehen, daß der Zuckerverbrauch aus dem umgebenden Medium in Explantaten der grauen Substanz der Gehirnrinde am intensivsten ist; im Laufe von 48 Stunden werden 50 bis 60 Proz. des Zuckergehalts im Medium verbraucht (es wurden 0,06 bis 0,053 Proz. Zucker anstatt 0,13 Proz. in der Kontrolle gefunden). Explantate aus dem zentralen Höhlengrau wiesen in diesem Versuch gleichzeitig einen ungefähr 40 Proz. des Gesamtgehalts betragenden Zuckerverbrauch auf. In den Explantaten aus der weißen Gehirnsubstanz erwies sich der Zuckerverbrauch als unbedeutend (etwa 15 Proz. des Gesamtgehalts).

In diesem Versuch wie auch in dem oben angeführten Versuch mit p_H-Messung wird man auf den erheblichen Zuckerverbrauch seitens der grauen Substanz der Rinde und auf den geringen Verbrauch in der weißen Substanz aufmerksam. In einzelnen Versuchen variierten die Ergebnisse der Analysen selbstverständlich, abhängig von verschiedenen Bedingungen (z. B. von dem Verhältnis zwischen der Größe des Stückchens und der Menge des Mediums und dergleichen); eine bestimmte Gesetzmäßigkeit der Resultate ließ sich aber immer konstatieren.



Um die Ergebnisse zu illustrieren, möchte ich noch die Resultate von zwei Versuchen anführen, deren einer mit p_H-Bestimmungen, der andere mit Abschätzung des Zuckerverbrauchs ausgeführt wurde. Die Resultate sind in den Abb. 2 und 3 graphisch dargestellt; die Versuche wurden nicht zu gleicher Zeit ausgeführt und das Material entstammte verschiedenen Tieren (ausgewachsenen Kaninchen), dennoch sind die Ergebnisse im ganzen völlig analog, obwohl im ersteren Falle eine physikalisch-chemische Methode angewandt und die p_H-Werte in einzelnen Kulturen bestimmt wurden, während im anderen Versuch (Abb. 3) die mikrochemische Methode zur Anwendung kam, wobei für eine jede Analyse vier bis fünf Explantate notwendig waren.

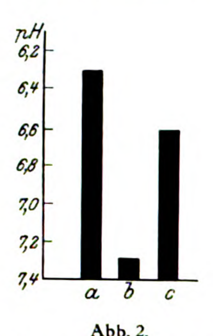


Abb. 2.
Die Wasserstoffionenkonzentration in 24stündigen Explantaten (im Plasma + Glucose) aus der:
a) grauen Substanz der Gehirnrinde,
b) weißen Gehirnsubstanz,
c) aus dem zentralen Höhlengrau.

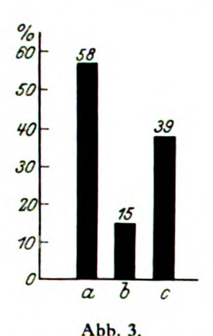


Abb. 3.
Zuckerverbrauch durch Explantate aus der:
a) grauen Substanz der Gehirnrinde,
b) weißen Gehirnsubstanz,
c) aus dem zentralen Höhlengrau.

Um den Vergleich der Stoffwechselintensität in Explantaten aus der Gehirnrinde mit derjenigen in Kulturen aus anderen Organen zu ermöglichen, seien die Resultate eines Versuchs angeführt, in dem analoge Explantate aus der grauen Substanz der Gehirnrinde und aus der Nierenrindensubstanz desselben ausgewachsenen Tieres angelegt worden sind (als Vergleichsmaterial sind selbstverständlich solche Explantate zu verwerten, die, ähnlich wie die Gehirnrinde, keine Wachstumserscheinungen aufweisen, da in den Kulturen aus embryonalen oder jungen Geweben, die in vitro energisch wachsen, auch der Stoffwechsel sehr intensiv verläuft). In 24stündigen Explantaten aus der grauen Substanz der Gehirnrinde wurden 0,062 Proz. Zucker gefunden, in denjenigen aus der Nierenrindensubstanz — 0,10 Proz., während die Kontrolle 0,14 Proz. Zucker enthielt. Obwohl der Nierenrindensubstanz, wie bekannt, ein intensiver Stoffwechsel eigen ist und auch in dem angeführten Versuch die Explantate aus der Nierenrinde im Laufe von 24 Stunden 29 Proz. des Gesamtgehalts an Zucker

im Medium verbraucht haben, ist der Zuckerabbau in den Gehirnrindenexplantaten doch noch viel erheblicher; er betrug 56 Proz. des zur Verfügung stehenden Zuckergehalts. Auf ähnliche Weise war auch die p_H-Verschiebung (in einem Medium mit Zusatz von 1 Proz. Glucose) in Explantaten aus der Gehirnrinde erheblich größer als in solchen aus Nierenrindensubstanz.

IV. Besprechung der Versuchsergebnisse.

Aus der Zusammenstellung der angeführten Resultate, sowie aus meinen zahlreichen anderen Versuchen (die hier nicht angeführt werden, um Platz zu sparen) ersieht man, daß es gelingt, in Explantaten aus verschiedenen Gehirnteilen ausgewachsener Tiere den Stoffwechsel wahrzunehmen und zu verfolgen. Die angeführten Ergebnisse zeigen unmittelbar, daß *der Stoffwechsel* (der Zuckerverbrauch, die Anhäufung der sauren Abbauprodukte) *in Explantaten aus der grauen Substanz der Gehirnrinde sehr intensiv verläuft und denjenigen der weißen Gehirnsubstanz erheblich übertrifft.* *Hirschberg* und *Winterstein* (4) haben auf Grund indirekter Überlegungen (indem sie angenommen haben, daß das Rückenmark des Frosches aus annähernd gleichen Teilen der grauen und der weißen Substanz bestehe, und daß sich die chemischen Prozesse in den beiden Markteilen nur quantitativ unterscheiden) vermutet, nachdem sie den Stoffwechsel im Rückenmark (s. oben, Einleitung) mit demjenigen der peripherischen Nerven verglichen haben, daß der Stoffwechsel in der grauen Substanz zwei- bis dreimal so groß ist, als in der weißen.

Meine Versuche mit der Explantation von Stückchen, welche aus dem Gehirn lebender oder soeben getöteter ausgewachsener Kaninchen aseptisch ausgeschnitten wurden, haben bei der physikalisch-chemischen Untersuchung im Laufe der ersten Versuchsstunden und bei der etwas später ausgeführten mikrochemischen Untersuchung *den direkten Beweis erbracht, daß der grauen Substanz der Gehirnrinde ein energischer Stoffwechsel eigen ist, weit überlegen demjenigen der weißen Gehirnsubstanz*[1]); der Stoffwechsel in dem *zentralen Höhlengrau ist auch ziemlich erheblich*, doch variierte er bedeutend in einzelnen Stückchen, die aus verschiedenen Teilen des Gehirns ausgeschnitten wurden (durch weitere Versuche soll diese Frage eingehender erörtert werden). Eine gewisse Vorstellung darüber, in welchem Maße der Stoffwechsel der grauen Gehirnsubstanz denjenigen mancher anderer Gewebe übertrifft, wird durch die oben angeführten

---

[1]) (Ergänzung bei der Vorbereitung des Vortrags zum Druck.) Vor kurzem haben *Wohlgemuth* und *Nakamura* (15) gezeigt, daß die graue Gehirnsubstanz imstande ist, Zucker auf oxydativem Wege abzubauen, und daß sie in ihrer Wirkung der weißen Substanz weit überlegen ist. Die Versuche waren auf die Weise ausgeführt, daß Menschengehirn, aus Leichen etwa 30 Stunden nach dem Tode entnommen, in Brei zerrieben (einzeln die graue und die weiße Substanz), mit physiologischer Salzlösung (+ Pufferlösung) mit Zusatz von Desinfiziens (Optochinum bas.) und Zucker verdünnt, im Laufe von 8 Stunden im Thermostat belassen (bei längerem Verweilen im Thermostat trat Fäulnis ein), dann 15 Stunden im Eisschrank aufbewahrt wurde: dann wurde der bei dem oxydativen Abbau des Zuckers entstehende Acetaldehyd nach *Neubergs* Methodik (16) bestimmt.



Resultate meiner vergleichenden Versuche gegeben, die gezeigt haben, daß der Stoffwechsel (Zuckerverbrauch, p_H-Verschiebung) in Explantaten aus der Gehirnrinde viel deutlicher zutage tritt, als in solchen aus der Nierenrindensubstanz ausgewachsener Kaninchen; letztere besitzt aber bekanntlich (vgl. auch die Versuche von *Krontowski* und *Bronstein* (8)] einen recht energischen Stoffwechsel im Vergleich zu vielen anderen Geweben [1]).

Ferner verdient ein weiterer interessanter Umstand erwähnt zu werden. Obwohl sich die intensivsten Stoffwechselvorgänge in den Gehirnexplantaten im Laufe der ersten Explantationsstunden abspielen und später, indem das Leben erlischt, immer schwächer werden, existiert der Stoffwechsel dennoch ganz bestimmt, beispielsweise 24 Stunden nach der Anfertigung der Explantate (die mikro-chemische Analyse der 24stündigen Explantate ergibt allerdings nur die endgültigen Resultate, die auch im Laufe der ersten Minuten und Stunden bei Fehlen weiterer Veränderungen gegen das Ende der Versuchszeit entstehen konnten). Indessen haben die Nervenzellen an mikroskopischen Präparaten (Färbung z. B. nach *Nissl* oder einfach mit Hämatoxilineosin) aus meinen 24stündigen Explantaten, die ja einen gewissen, obschon abgeschwächten Stoffwechsel aufweisen und also noch am Leben sind, nicht mehr das normale Aussehen: an gefärbten Präparaten erscheinen die Kern- und Cytoplasmastrukturen stark alteriert [2]) [vgl. auch *Veratti* (13)]. Da alle angeführten Ergebnisse betreffend den energischen Stoffwechsel in Explantaten im Vergleich zu verschiedenen Kontrollen, sowie der festgestellte scharfe Unterschied im Stoffwechsel der grauen und der weißen Gehirnsubstanz darauf hinweisen, daß die wahrgenommenen Stoffwechselerscheinungen eben an die Anwesenheit von *lebendem*, wenn auch *morphologisch verändertem Nervengewebe* bzw. Nervenzellen der grauen Gehirnsubstanz geknüpft sind, so muß gedacht werden, daß die üblichen morphologischen Kriterien nicht ausreichen, um über solch einen fundamentalen Lebensvorgang wie den Stoffwechsel ein Urteil zu gewinnen: in einem morphologisch stark veränderten Gewebe kann ein energischer Stoffwechsel stattfinden. Dafür sprechen auch die schon erwähnten Versuche von *Hirschberg* und *Winterstein* (3): Beim Zerreiben des Rückenmarks in einem Glasmörser und bei Ausführung der Versuche mit diesem Gewebebrei anstatt des ganzen überlebenden Rückenmarks stellen diese Untersucher keine Verminderung des Glucoseverbrauchs fest. Da weder der Brei aus abgetötetem Gewebe noch das von lebenden Gewebepartikelchen freie Filtrat den beschriebenen Zuckerverbrauch beobachten ließen, kamen die Autoren zu dem Schluß, daß der festgestellte Glucoseverbrauch (sowie sonstige Stoffwechselerscheinungen) nicht etwa von einem löslichen Ferment abhängen, sondern durch die Anwesenheit lebender Gewebepartikelchen bedingt seien. In diesem Sinne sind auch meine Kontrollversuche zu deuten, in welchen ich nicht nur durch Erwärmung abgetötete, sondern auch aseptisch autolysierte Gehirnstückchen explantierte; in letzteren blieben die Fermente erhalten, jedoch lebten die Zellen nicht mehr. Die Ergebnisse der genannten Autoren als auch die

---

[1]) Vgl. die in den Tabulae biologicae **3**, 1926, zusammengestellten Daten.

[2]) Allerdings ändert sich das Verhalten der Nervenzellen gegen Färbung auch in dem Falle, wenn das ausgeschnittene Gehirnstückchen nicht sofort fixiert, sondern eine Zeitlang beispielsweise in Tyrodelösung belassen wird.



Zusammenstellung meiner physikalisch-chemischen und mikro-chemischen Feststellungen mit den morphologischen Bildern in meinen Versuchen lassen es glauben, daß es für die Erhaltung des Stoffwechsels, ja eines solchen von bedeutender Intensität, die morphologische Intaktheit (bezüglich der Färbbarkeit und dergleichen) und Ganzheit der Gewebe und Zellen nicht unbedingt notwendig ist; eher dürfte man vermuten, daß die Erhaltung von *lebendem Protoplasma* (mit dessen inneren Katalysatoren) im Gewebe und in den Zellen oder sogar in Zellfetzen dazu genüge.

Jedenfalls findet in Explantaten aus verschiedenen Teilen des Gehirns ausgewachsener Tiere ein mehr oder minder intensiver Stoffwechsel statt; das Vorhandensein und die Größe dieses Stoffwechsels lassen sich, wie es meine Versuche gezeigt haben, mittels physikalisch-chemischer und mikrochemischer Methoden abschätzen. Ich möchte noch in methodologischer Hinsicht darauf aufmerksam machen, daß für die Explantation ganz kleine Gewebestückchen genügen (0,5 mm Durchmesser und darunter); es ist also möglich, mittels eines Präpariermikroskops und entsprechender Instrumente genau bestimmte kleinere Bezirke, bestimmte Zellgruppen aus der Gehirnrinde, aus den Kernen oder tiefer gelegenen Gehirnabschnitten für die Explantation herauszuschneiden und für verschiedene Versuche zu gebrauchen, wenn nötig nach der oder jener experimentellen Einwirkung in vivo. Da die explantierten Stückchen des weiteren für mannigfache Einwirkungen in vitro leicht zugänglich sind, so scheint auch dieser Umstand die beschriebene Methodik zum Studium mancher Fragen geeignet zu machen.

Zusammenfassung.

1. Die Anwendung physikalisch-chemischer und mikro-chemischer Methoden zum Studium des Lebens der Explantate gestattet es, den Stoffwechsel in Explantaten aus verschiedenen Teilen des Gehirns (und anderen Teilen des Nervensystems) ausgewachsener Tiere zu untersuchen.

2. In Explantaten aus der grauen Substanz der Großhirnrinde ausgewachsener Kaninchen gelang es, intensive Stoffwechselvorgänge wahrzunehmen (schon nach einigen Stunden trat unter den angegebenen Bedingungen eine Verschiebung der Wasserstoffionenkonzentration nach der sauren Seite, ferner ein energischer Glucoseverbrauch ein), welche z. B. denjenigen in Explantaten aus Nierenrindensubstanz ausgewachsener Tiere (wo ebenfalls ein ziemlich energischer Stoffwechsel stattfindet) weit überlegen sind.

3. Die graue Substanz der Gehirnrinde weist unter diesen Bedingungen einen weit intensiveren Stoffwechsel auf als die weiße Gehirnsubstanz; der Stoffwechsel im zentralen Höhlengrau hat sich im allgemeinen ebenfalls als ziemlich energisch erwiesen, doch variiert er, abhängig von verschiedenen Bedingungen: von der Stelle, aus der das Stückchen ausgeschnitten worden ist, von dessen Gehalt an Nervenzellen und dergleichen.

4. Da man für die Explantation mit sehr kleinen Gewebestückchen (0,5 mm Durchmesser und darunter) auskommen kann, so ermöglicht



die beschriebene Methodik das Studium des Stoffwechsels in ganz kleinen einzelnen Punkten des Gehirns (Rinde, Kerne), wenn sie auch nur kleinere Gruppen einzelner Nervenzellen darstellen, unter Bedingungen, die verschiedenen zu untersuchenden Einwirkungen in vivo und in vitro leicht zugänglich sind.

Literatur.

1) *Burrows,* The Journ. of exper. Zoology **10,** 63, 1911. — 2) *Harrison,* The Anatomical Record Nr. 5, 1907; The Journ. of exper. Zoology **9,** 787, 1911. — 3) *Hirschberg* und *Winterstein,* Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. **100,** 185, 1917; **101,** 212, 248, 1918. — 4) *Dieselben,* ebendaselbst **108,** 27, 1919. — 5) *Ingebrigtsen,* The Journ. of exper. Med. **17,** 182, 1913. — 6) *Derselbe,* ebendaselbst **18,** 412, 1913. — 7) *Krontowski,* Wratschebnoje Djelo Nr. 21, 1925 (russ.); Münch. med. Wochenschr. 1926, Nr. 34. — 8) *Krontowski* und *Bronstein,* Arch. f. exper. Zellforschung **3,** 32, 1926. — 9) *Krontowski, Jazimirska-Krontowska* und *Magath,* Wratschebnoje Djelo Nr. 14, 1926 (russisch). — 10) *Krontowski, Bereschanski* und *Majewski,* Arch. f. exper. Zellforschung **3** (im Druck). — 11) *Levi,* Rendiconte della R. Accad. dei Lincei, Ser. V, **12,** 1917. — 12) *Marinesco* und *Minea,* Anatomischer Anzeiger **42,** 161, 1912; C. r. de Biol. **73,** 346 und 668, 1912. — 13) *Veratti,* Bolletino Nr. 1—2 del 1919 della Societá Med.-Chirurg. di Pavia. — 14) *Warburg, Posener* und *Negelein,* diese Zeitschr. **152,** 309, 1924. — 15) *Wohlgemuth* und *Nakamura,* ebendaselbst **175,** 233, 1926. — 16) *Neuberg* und *Reinfurth,* ebendaselbst **89,** 365; **92,** 234, 1918.

Zur Frage des anhydridartigen Charakters der Eiweißstoffe.

Von

N. D. Zelinsky und N. I. Gawrilow.

(Aus dem organisch-chemischen Laboratorium der 1. Universität Moskau.)

(Eingegangen am 4. Januar 1927.)

Vor einigen Jahren veröffentlichten *Zelinsky* (1) und *Ssadikow* und *Zelinsky* (2) die Resultate einer von ihnen bereits 1913/14 ausgeführten Untersuchung, welche infolge des Krieges und seiner Nachwirkungen erst 1923 in Deutschland veröffentlicht werden konnten.

Es handelte sich in dieser Arbeit um die Hydrolyse von Eiweißstoffen mittels verdünnter Säuren in einem auf 180° erhitzten Autoklaven. Die Verfasser haben dabei bewiesen, daß das Hydrolysat neben den Aminosäuren *bedeutende Mengen von Anhydriden der Aminosäuren* enthält. Im Hydrolysat der Gänsefedern betrug diese Anhydridfraktion bis zu 50 Proz. von der Gesamtmenge der Produkte der Hydrolyse. Die Konsequenzen dieser Arbeit, d. h. die Möglichkeit der Präexistenz von Anhydridgruppierungen in der Eiweißmolekel, sowie die Methode der Hydrolyse mittels verdünnter Säuren wurden von *Brigl* (3) erörtert, der aus Glycyl-glycin beim Erwärmen einer 20proz. Lösung desselben in 0,5proz. Salzsäure das Glycinanhydrid erhielt, während *Abderhalden* (4) unsere Arbeit einer Kritik unterzog, indem er die Neigung einer Reihe von Dipeptiden zur Anhydrisierung nicht nur im Autoklaven bei 180° nachwies, sondern auch beim Erwärmen mit Wasser auf 100°. Abgesehen von dem seiner Form nach unzulässigen und seinem Wesen nach unrichtigen und parteiischen Verhalten *Abderhaldens* gegen die von uns erzielten Resultate, scheint es uns merkwürdig, daß unsere schlechte Arbeit, die nach seiner Ansicht zur Entwicklung der Proteinchemie nichts beigetragen hat und dieselbe sogar eher hemmt, ihn dazu bewog, unsere Hydrolysenmethode anzuwenden und die Anwesenheit von Anhydridgruppierungen in den Proteinen durch eine Reihe von Versuchen zu beweisen. Indem wir zugeben, daß die große Autorität *Abderhaldens* wohl keinem Zweifel unterliegt, begrüßen wir unsererseits seinen Entschluß, unsere weiteren Mitteilungen zu ignorieren, da uns das die volle Garantie gibt, von ungerechten Angriffen verschont zu bleiben. Zufälligerweise übersah *Abderhalden* die

Tatsache, daß *Zelinsky* und *Ssadikow* als erste auf die Bedeutung der Anhydride als Bausteine der Eiweißstoffe hinwiesen. Auf ein ähnliches Verhalten *Abderhaldens* gegen fremde Arbeiten und Ignorierung der in denselben mitgeteilten Daten wiesen neulich auch *Herzog* (5) und *Loew* (6) hin. *Abderhalden* belehrt uns, daß jede Hydrolyse als katalytischer Prozeß zu betrachten sei, und hält deshalb unsere Bezeichnung „Katalytische Spaltung von Eiweißstoffen" für die Hydrolyse mit Hilfe von 1- bis 2proz. Mineralsäuren für nicht richtig.

Bekanntlich wurde die Hydrolyse von Eiweißstoffen bis zur letzten Zeit mit Hilfe von rauchender Salzsäure im großen Überschuß oder mit Hilfe von 25- bis 30proz. Schwefelsäure ausgeführt, während wir stark verdünnte Säure anwenden, die katalytisch wirkt, indem sie die Hydrolyse beschleunigt. Deshalb gelang es uns auch, die Anhydride in bedeutender Menge zu isolieren, was bei Anwendung eines großen Überschusses von starker Säure unmöglich wäre, da in diesem Falle die Anhydride bis zu den Aminosäuren hydrolysiert würden.

Freilich gelingt die partielle Hydrolyse von Eiweißkörpern auch mit Hilfe von Wasser bei 180°, aber nicht so vollständig, wie in Gegenwart einer geringen Menge von Salz- oder Schwefelsäure. Die Wasserstoffionenkonzentration ist in diesem Falle bedeutend größer und die hydratisierten Kerne der Wasserstoffionen (H_3O^+) bewirken eine raschere Hydrolyse. Wir haben somit unseren Prozeß ganz richtig als einen katalytischen bezeichnet.

Die Frage nach dem anhydridartigen Bau der Eiweißmolekel gewinnt in letzter Zeit immer mehr an Wahrscheinlichkeit, wie das auch aus den Arbeiten von *Herzog* (7) und *Bergmann* (8) hervorgeht.

Jetzt ist es klar, daß *Zelinsky* und *Ssadikow* eine so große Menge von Aminosäureanhydriden aus dem Eiweißhydrolysat ausgeschieden haben, wie sie bei der Annahme einer ausschließlich polypeptidischen Struktur der Proteine nicht zu erwarten wäre. Sie hatten in ihren Händen unzweifelhaft Anhydride, die in der Eiweißmolekel zum größten Teile bereits präexistierten. Was die Anhydrisierung der Dipeptide nach Versuchen von *Brigl*, *Jaitschnikow* (9), *Abderhalden* (10) und *Lüdke* (11) anbetrifft, so geht dieser Prozeß nach unseren Beobachtungen hauptsächlich in neutralem Milieu und bei hoher Konzentration des Dipeptids vonstatten.

Dieser Vorgang wird durch Säuren stark verzögert, und bei Gegenwart von 1 Mol. Säure oder etwas mehr auf je eine NH_2-Gruppe hört die Anhydrisierung ganz auf. Letztere ist offenbar von derselben Ordnung wie die „Maskierung" des Aminostickstoffs durch Mineralsäuren. Bei der Anhydrisierung in neutralem Milieu geht eine Acylierung der Aminogruppe durch die eigene Carboxylgruppe des Polypeptids unter Bildung eines inneren Imids vor sich.

Dieser Prozeß ist umkehrbar, und die Anwesenheit einer fremden Säure bestimmt, je nach der Natur derselben, ihrer Menge, der Temperatur und Individualität des Polypeptids selbst, das Gleichgewicht desselben.

Die Annahme *Lüdkes* von der Existenz des Gleichgewichts: Aminosäure—Dipeptid—Anhydrid, ist wenig wahrscheinlich. Viel richtiger erscheint die Annahme, daß im sauren Medium sich das Gleichgewicht zwischen Aminosäure—Dipeptid einstellt, während in neutralen Lösungen das Gleichgewicht zwischen Dipeptid und Anhydrid vorherrscht.

In neutraler Lösung entsteht aus dem Dipeptid gar keine Aminosäure, während bei Gegenwart von Säuren das Dipeptid kein Anhydrid bildet. Solch eine Deutung des Gleichgewichts wird durch unsere Bestimmungen des NH_2- und Gesamtstickstoffs nach der Hydrolyse des Leucyl-glycins bestätigt (Tabelle I der folgenden Mitteilung; Versuche 10, 11, 12, 13). Aus dem Verhältnis zwischen dem NH_2- und Gesamtstickstoff (Spalte 8) in neutraler Lösung nach der Abscheidung der entstandenen Anhydride ist zu ersehen, daß dieses Verhältnis nicht höher als 50 ist, d. h. es ist nur das Dipeptid vorhanden und nichts spricht für einen parallel verlaufenden Spaltungsprozeß desselben. Das Anhydrid ist in saurer Lösung leichter löslich als in neutraler, weshalb in den Versuchen 13 und 14 kein Zuwachs der NH_2-Gruppen zu beobachten ist, sondern im Gegenteil das Verhältnis des NH_2-zum Gesamtstickstoff kleiner wurde wegen des gelösten Anhydrids, welches frei von titrierbarem Stickstoff ist. In den Versuchen von *Abderhalden*[1]) und *Komm* sehen wir, daß die Anhydrisierung des Glycyl-glycins in Salzsäure, im Vergleich zu der in neutralem Medium, selbst bei 0,6 mol. Lösung, von 84,4 Proz. bis auf 8,8 Proz. sinkt, während in 1 mol. Lösung die Anhydrisierung ganz aufhört. Leucyl-glycin läßt sich in 1- und 2 mol. Salzsäurekonzentrationen nicht anhydrisieren; das gleiche gilt auch für Glycyl-phenylalanin.

Wir haben bemerkt, daß die Neigung zur Anhydrisierung mit dem Molargewicht der das Dipeptid bildenden Aminosäuren zunimmt. Bei der Hydrolyse der Dipeptide in zugeschmolzenen Röhren in neutraler wässeriger Lösung gab das Hydrolysat von *Abderhalden* immer die Ninhydrinreaktion, die auf die Anwesenheit von Aminosäuren unter den Produkten der Hydrolyse hinweist. Es kann keinem Zweifel unterliegen, daß bei einer Temperatur von 180°, wie wir es beobachtet haben, bei manchen Sorten der Röhren eine Auslaugung des Glases stattfindet, weshalb die Lösung merklich alkalisch wird. Diese Alkalität kann

---

[1]) l. c.



einen sekundären hydrolytischen Nebenprozeß unter Spaltung des Dipeptids in Aminosäuren zur Folge haben.

Wir können somit sagen, daß bei der Hydrolyse einer 10proz. Lösung eines Proteins mit Hilfe von 1- bis 3proz. Salzsäure im Autoklaven bei 180° die unter den Spaltungsprodukten des Proteins ausgeschiedenen Anhydride nicht als Anhydrisierungsprodukte der entstandenen Dipeptide zu betrachten sein werden, sondern als native Bausteine, die in der einen oder anderen Form am Bau der Eiweißmolekel teilnehmen.

Es ist bei den Versuchen zu beachten, daß die Menge der verdünnten Mineralsäuren annähernd gleich derjenigen des im Hydrolysat zu erwartenden Aminostickstoffs sei. Es sind hierzu z. B. 10 g Eiweißstoff in 100 ccm 3½proz. Salzsäure zu hydrolysieren.

Da aber bei der Hydrolyse der Eiweißmolekel Carboxylgruppen frei werden, so muß man, der Vorsicht halber, die Säurekonzentration verringern und die Hydrolyse mit 1- bis 2proz. Salzsäure oder 2- bis 3proz. H_2SO_4 führen, welche Konzentration in den ersten Versuchen von *Zelinsky* und *Ssadikow* auch eingehalten wurde.

Würde unter den von uns gewählten Bedingungen die Anhydrisierung der Dipeptide doch erfolgen, so müßte man infolge der Neubildung von CONH-Bindungen eine Abnahme des NH_2-Stickstoffs beobachten. Dies sollte sich besonders bei der Untersuchung des fermentativen Eiweißhydrolysats bemerkbar machen. Die bei der nachfolgenden Autoklavenhydrolyse abgespaltenen Peptide müßten sich anhydrisieren und würden zweifellos eine Verringerung des relativen Gehalts an NH_2-Stickstoff gezeigt haben.

In Wirklichkeit ist, wie aus unten zu besprechendem Material erhellt, bei Autoklavenhydrolyse sowohl der Proteine selbst, als deren fermentativer und Säurehydrolysate keine Verringerung der Menge des NH_2-Stickstoffs zu merken. Im Gegenteil werden die fermentativen Hydrolysate (Trypsinhydrolysate in alkalischer Lösung) weiter leichter hydrolysiert als unverändertes Eiweiß, und zwar nicht nur in saurem, sondern auch in neutralem Medium. Das in alkalischer Lösung teilweise bis zum Peptid zerfallene Anhydrid läßt sich in saurer Lösung weiter leichter hydrolysieren als die unveränderten Anhydride, wie aus den Daten der beistehenden Tabelle I zu ersehen ist.

Indem die Fermente das Eiweiß partiell hydrolysieren, bereiten sie dasselbe zur weiteren Hydrolyse durch verdünnte Säuren vor.

Nicht nur die fermentativen Eiweißhydrolysate werden im Autoklaven durch verdünnte HCl nicht anhydrisiert, sondern auch die neutralen, stark konzentrierten Lösungen solcher Hydrolysate (24 Proz. Eiweiß enthaltend, nach dem N-Gehalt) weisen keine Verringerung des NH_2-Stickstoffs auf (Tabelle II).

Tabelle I.

Versuche mit Gelatine.

Versuch *) Nr.	Vorherige Bearbeitung	Säurehydrolyse im Autoklaven	Verhältnis zwischen NH_2- und Gesamtstickstoff Proz.
15	—	3 Stdn. in 1 proz. HCl	34,2
82	Trypsinhydrolyse 60 Stdn.	—	19,6
85	Dieselbe	3 Stdn. in 1 proz. HCl	50,8
88	Trypsinhydrolyse 120 Stdn.	—	27,6
97	Dieselbe	3 Stdn. in 1 proz. HCl	52,0

*) Versuche siehe dritte Mitteilung.

Tabelle II.

Versuche mit Gelatine.

Versuch Nr.	Vorherige Bearbeitung	Eiweiß in der Lösung Proz.	Autoklaven-hydrolyse 180°	Verhältnis zwischen NH_2- u. Gesamt-N Proz.
82	Trypsinhydrolyse 60 Stdn.	13	—	19,6
93	Dieselbe	13	Neutr. Lösung	40,0
94	Trypsinhydrolyse 120 Stdn.	24	—	35,2
95	Dieselbe	24	Neutr. Lösung	42,3

Auch hier war eine Anhydrisierung nicht zu konstatieren; die Spaltung des Hydrolysats im Autoklaven ging weiter vor sich, und zwar um so tiefer, in je geringerem Stadium der fermentativen Hydrolyse sie unterbrochen wurde. So z. B. vergrößerte sich der Gehalt an NH_2-Gruppen in einem Trypsinhydrolysat bei nachfolgender Hydrolyse um das Doppelte.

Wir sehen somit, daß *man nach dem Verhalten der Dipeptide*[1]) *gegen die Autoklavenhydrolyse*, sowie nach den Untersuchungen von *Abderhalden* mit Mitarbeitern, sowie *Lüdke*, als auch auf Grund *der Untersuchung der Eiweißhydrolyse unter verschiedenen Bedingungen* zugeben muß, daß die *Autoklavenhydrolyse* von *Zelinsky* und *Ssadikow zur Ausscheidung derjenigen Anhydridkomplexe aus den Proteinen, die in deren Molekel bereits vorhanden waren, geeignet ist.*

Des weiteren glauben wir, daß die Anhydride in der Eiweißmolekel eine recht wichtige Rolle spielen, indem sie an der Bildung von untereinander in noch unbekannter Weise gebundenen Komplexen teilnehmen. Auch ist hier die Teilnahme von Kräften der Nebenvalenzen nach *Herzog*, Äthergruppierungen und vielleicht auch irgendwelchen anderen Verbindungsformen nicht ausgeschlossen.

[1]) Siehe folgende Mitteilung.

Die Proteine verschiedener Klassen enthalten allem Anschein nach verschiedene Anhydridgruppierungen in der Molekel.

In den Proteinen mit geringem Anhydridgehalt muß die offene Dipeptidbindung merklich ansteigen. Vom Standpunkt der Genesis des Eiweißes muß das plastische Eiweiß vom Typus des Albumins weniger Anhydride enthalten als das Reserveglobulin oder Gewebeeiweiß, wie Keratin oder Gelatine.

Die Protamine, die nach *Kossel* jenen Kern repräsentieren, von dem aus die Bildung der komplizierten Eiweißmolekel beginnt, enthalten offenbar nur eine minimale Anhydridmenge.

Vergleicht man die Tiefe der Autoklavenhydrolyse bei verschiedenen Eiweißstoffen und berechnet diejenige N-Menge, die dem Gehalt an NH_3 und Diaminosäuren entspricht (deren mit Formol untitrierbaren Stickstoff), so läßt es sich schon jetzt annehmen, daß die Ansicht von der schwachen Teilnahme der Anhydride am Bau des plastischen Eiweißes ihre Begründung in den Tatsachen findet (vgl. Tabelle III).

Tabelle III.

Versuch Nr.	Eiweißstoffe	Hydrolysiert Stdn.	Verhältnis des NH_2- z. Ges.-N nach der Autoklavenhydrolyse Proz.	Menge in Proz. zum Gesamt-N, m. Formol titriert im völlig hydrolysierten Eiweiß berechnet	Proz. zum Gesamt-N		
					Ammoniak-N	Anhydrid-N	Peptid-N
15	Gelatine	3	34,2				
16	„	6	42,2	88	2	30—50	30—50
17	„	9	51,7				
19	„	24	55,4				
44	Albumin	3	45,2				
45	„	6	45,7	88,5	7,1	35	40
46	„	9	45,9				
49	Casein	3	45,9				
50	„	6	50,4	90	13	40	35—40
51	„	9	51,5				
54	Gliadin	3	49,2				
55	„	6	49,5	95	29	45	22
56	„	9	51,2				
58	Sturinsulfat	3	37,1				
59	„	6	49,6	55	—	5—10	40—50
60	„	9	50,6				
61	„	12	51,9				

Da gleichzeitig mit Hydrolyse der Peptidbindung auch die Hydrolyse einiger verhältnismäßig leichter hydrolysierbarer Anhydride (z. B. Glycylanhydrid, welches weder von uns noch von anderen Forschern je unter den Zerfallsprodukten des Eiweißes aufgefunden wurde) stattfindet, so muß man zugeben, daß die den Daten der Tabelle III entsprechenden



Anhydridmengen viel zu niedrig erscheinen, was besonders von den Anhydridformen der Gelatine gilt.

Die Daten der Kolumne 5 berechneten wir unter Berücksichtigung des in den entsprechenden Eiweißstoffhydrolysaten mit Formol nicht titrierbaren Stickstoffs[1]).

Wie aus Tabelle III zu ersehen ist, ist der Anhydridgehalt in der Sturinmolekel am geringsten und in der Gelatinemolekel am größten. Die Gliadinmolekel enthält ebenfalls eine recht bedeutende Anhydridmenge, die der in der Gelatine nahe kommt.

Freilich ist der Anhydridgehalt laut dieser Tabelle nur ein annähernder, und eher geringer als in Wirklichkeit.

Beachtenswert ist auch, wie langsam bei der Autoklavenhydrolyse der Gelatine die Menge der NH_2-Gruppen ihren Grenzwert erreicht.

Während bei den anderen Eiweißstoffen die Menge der NH_2-Gruppen im Hydrolysat nach 3 und nach 9 Stunden Erwärmung fast gleich ist, braucht Gelatine zur vollständigen Spaltung 24 Stunden.

Wir erklären das durch die Anwesenheit einer größeren Menge von Glycinanhydrid in der Molekel der Gelatine, welches sich nur langsam spaltet.

Da die Anhydridstruktur der Proteine neue Gesichtspunkte in der Chemie der Eiweißstoffe eröffnet, setzen wir die Untersuchungen auf diesem Gebiete fort.

Literatur.

1) *Zelinsky*, Catalyse naturelle et artificielle des corps protéiques: Annales de la Société d'encouragement des Seiences expérimentales du nom Christophe Lédentzoff 2, 48, 1914. — 2) Diese Zeitschr. **136**, 241, 1923; **137**, 401, 1923; **138**, 156, 1923; **147**, 30, 1924. — 3) Berl. Ber. **56**, 1887, 1923. — 4) Zeitschr. f. physiol. Chem. **139**, 186, 1924. — 5) Ebenda **141**, 158, 1924. — 6) Berl. Ber. **58**, 2807, 1925. — 7) Die Naturwissenschaften **12**, 172, 1923. — 8) Ebenda **12**, 1155, 1925. — 9) Journ. d. russ. phys.-chem. Gesellsch. **52**, 145, 1920. — 10) Zeitschr. f. physiol. Chem. **139**, 164, 181; **140**, 92; **143**, 128; **145**, 306. — 11) Ebenda **141**, 100, 1924.

---

[1]) *O. Kestner*, Chemie der Eiweißkörper, 1925.

Autoklavenhydrolyse von Dipeptiden und Anhydriden der Aminosäuren.

Von

N. D. Zelinsky und **N. I. Gawrilow.**

(Aus dem organisch-chemischen Laboratorium der I. Universität Moskau.)

(Eingegangen am 4. Januar 1927.)

Nachdem *Zelinsky* und *Ssadikow* (1) bewiesen haben, daß das Produkt der Autoklavenhydrolyse von Keratin aus Gänsefedern mittels verdünnter Säuren fast bis zu 50 Proz. aus verschiedenen Aminosäureanhydriden besteht, war es einleuchtend, daß die Eiweißmolekel nicht nur aus polypeptidartig verbundenen Aminosäuren besteht, sondern daß auch die Anhydride im Bau der Keratine eine große, ja sogar dominierende Rolle spielen müssen.

Ungeachtet dessen, daß, gleichzeitig mit uns und von anderen Gesichtspunkten ausgehend, mehrere Forscher (*Herzog*, *Bergmann*, sowie *Karrer* und *Abderhalden*) die Existenz von Anhydridformen in der Eiweißmolekel bewiesen haben, gab die Arbeit von *Brigl* (2) über die Anhydrisierung des Glycyl-glycins unter Bedingungen, die denen von *Zelinsky* und *Ssadikow* ähnlich sind, Veranlassung, die Möglichkeit der Präexistenz von Anhydriden in der Eiweißmolekel vor der Hydrolyse zu bezweifeln.

Zur Klärung dieser Frage wollen wir nun das Verhalten der Dipeptide und Anhydride gegen Erhitzen mit verdünnten Säuren bei 180^0 näher ins Auge fassen. Die neueren Arbeiten von *Abderhalden* (3) sowie von *Lüdke* (4) überzeugten uns von der Notwendigkeit, die begonnene Arbeit fortzusetzen, da wir über die für die Anhydrisierung von Polypeptiden besonders günstigen Bedingungen noch immer im unklaren blieben. Unsere Versuchsergebnisse stimmten ganz mit den Daten und Schlußfolgerungen von *Lüdke* überein, bestätigen ferner die Beobachtungen der *Abderhalden*schen Schule und gehen doch mit den endgültigen Ansichten der letzteren über diese wichtige und interessante Frage weit auseinander.



Wir untersuchten die Anhydride und die ihnen entsprechenden Dipeptide: Glycyl-glycin, Alanyl-alanin, Leucyl-glycin, Phenyl-alanyl-alanin. Die letzteren, mit Ausnahme des Alanyl-alanins, wurden in 1 proz. Salzsäurelösung bei 10 proz. Konzentration der Substanz im Autoklaven bei 180^0 im Laufe von 3 Stunden hydrolysiert, wobei die Hydrolyse um so weiter ging, je höher in der homologen Reihe die entsprechende Aminosäure stand.

Experimenteller Teil.

Die erwähnten Dipeptide sowie die zwei ersten Anhydride wurden von uns nach den üblichen Methoden bereitet; das Leucyl-glycin- sowie das Phenyl-alanyl-alanin-anhydrid werden durch Erwärmen der entsprechenden Dipeptide mit Wasser im Autoklaven bei 180^0 dargestellt. Unter diesen Bedingungen werden beide analysenrein erhalten. Bei einer Konzentration der wässerigen Lösung des Leucyl-glycins von 50 Proz. war die Anhydridausbeute etwa 80 Proz.

Bei Phenyl-alanyl-alanin in 26 proz. wässeriger Lösung war die Ausbeute eine theoretische.

Beim Umkristallisieren aus Wasser enthielt die Mutterlauge gar keinen Aminostickstoff.

In allen Versuchen wurde der Aminostickstoff nach der *Sörensen*-schen, von einem von uns (*Gawrilow*) derart modifizierten Methode bestimmt, daß die anfängliche Neutralisation der Lösung auf unmittelbar vor der Titration zugesetztes Neutralrot ($p_H = 7,1$) eingestellt wurde.

Die zu untersuchenden Dipeptide und Anhydride wurden in Röhrchen abgewogen, wonach Wasser oder Säure in der einen oder anderen Konzentration zugesetzt, das Röhrchen zugeschmolzen und bei 180^0 erhitzt wurde.

Fast alle Hydrolysate wiesen einen sprit-aldehydartigen Geruch auf. Es wurde der Gesamt- und Aminostickstoff bestimmt. In den Fällen, wo während der Hydrolyse ein Niederschlag ausfiel, wurde derselbe abfiltriert, gewaschen und Filtrat sowie Niederschlag mit Formol titriert.

Der prozentuale Zerfall des Dipeptids wurde durch Subtraktion von den Prozenten des Aminostickstoffs im Verhältnis zum Gesamtstickstoff (nach der Hydrolyse des positiven beim Ansteigen des Aminostickstoffs), Prozente im unhydrolysierten Dipeptid und Multiplikation mit 2 berechnet (es konnten nur 50 Proz. des Gesamtstickstoffs hydrolysiert werden). Die Prozente des Aminostickstoffs nach der Hydrolyse von Anhydriden gaben unmittelbar den Grad des stattgehabten Zerfalls an.

Versuch 20 wurde derart ausgeführt, daß der Hydrolyse im zugeschmolzenen Rohre das Dipeptid in 10 proz. Lösung unterworfen

wurde, die übrigen 10 Proz. bestanden aus Aminosäuren in gleichen Mengen: etwa 0,2 g Glykokoll, 0,2 g Alanin, 0,2 g Phenyl-alanin und 0,2 g Leucin. Die Menge des Aminostickstoffs vor der Hydrolyse wurde berechnet.

Glycyl-glycin. Bei der Hydrolyse seiner 10proz. Lösung in 1proz. Salzsäure im Laufe von 3 Stunden geht der Zerfall bis zu 74,4 Proz., und enthält das Hydrolysat keine unlöslichen Produkte. Die von *Brigl* und *Abderhalden* beobachtete Anhydrisierung war die Folge einer erhöhten Konzentration des Dipeptids (wie aus unseren Versuchen mit anderen Peptiden in der Tabelle I erhellt) und einer schwachen Säurekonzentration, die zur Bindung der Aminogruppe des Dipeptids und der Aminosäure aus ihm nicht ausreicht.

Glycinanhydrid. Dasselbe zerfällt binnen 3 Stunden bei 10proz. Konzentration fast vollständig, bis zu 94,8 Proz., was mit den Versuchen von *Lüdke* übereinstimmt.

Alanyl-alanin. Nach dreistündiger Hydrolyse seiner 5proz. Lösung in 1proz. Salzsäure (die geringe Menge von Kristallen geht bei der Erwärmung leicht in Lösung) zeigt das Sinken des Stickstoffgehalts eine Anhydrisierung von etwa 2 Proz. des Peptids an.

Alaninanhydrid. Nach dreistündiger Hydrolyse zerfielen etwa 50 Proz. des Anhydrids.

Leucyl-glycin. In neutraler, wässeriger, 10- und 50proz. Lösung geht die Anhydrisierung, die im letzten Falle bis 84 Proz. vom genommenen Peptid erreicht. Selbst 0,5 proz. Salzsäure drückt die Anhydrisierung bis auf 70 Proz. herab, *während 1proz. Säure zur Hydrolyse des Peptids führt.* In den Versuchen 10, 11, 13, 14 und 15 blieben in den Röhrchen Niederschläge. Versuch 12 verlief ohne Bildung eines Niederschlags.

Der Versuch stimmt mit dem von *Abderhalden* und *Komm* überein.

Leucyl-glycinanhydrid. Dasselbe zerfällt bei der Hydrolyse mit 1proz. Salzsäure in einer Menge von etwa 40 Proz. und bei Anwendung 5proz. Säure fast vollständig.

Phenyl-alanyl-alanin. In neutraler, wässeriger Lösung geht nach Versuchen von *G. Kapelkin* die Anhydrisierung des Peptids bis zu Ende. In schwach saurer Lösung findet nur geringe Anhydrisierung statt, da ein geringer Niederschlag gebildet wird, wobei aber doch etwa 10 Proz. des Peptids zerfallen. 5proz. Salzsäure ruft Hydrolyse bis zu 63 Proz. des Peptids hervor. Im Widerspruch mit diesem Versuch steht der Versuch von *Abderhalden* und *Komm* mit Glycyl-phenyl-alanin, bei dem sie eine geringe Neigung zur Anhydrisierung konstatierten. Die außerordentlich starke Neigung des Phenyl-alanyl-

Tabelle I. Hydrolyse von Dipeptiden.

Nr.	Versuchsbedingungen	Konzentration		Gesamt-N	Amino-N	Proz. Amino-N vom Gesamt-N	Proz. des Zerfalls	Proz. der Anhydrisierung
		Peptid Proz.	Säure	g	g			
	Glycyl-glycin:							
1	Vor der Hydrolyse	10	1 Proz.	0,0847	0,0418	49,4	—	—
2	Nach der Hydrolyse 2 Stunden	10	1 „	0,0839	0,0584	69,6	39,2	—
3	Vor der Hydrolyse	10	1 „	0,1576	0,0785	49,8	—	—
4	Hydrolyse 3 Stunden	10	1 „	0,1571	0,0137	87,2	74,4	—
	Alanyl-alanin:							
5	Vor der Hydrolyse	10	1 „	0,0284	0,0142	50,0	—	—
6	Hydrolyse 1 Stunde	10	1 „	0,0317	0,0146	46,0	—	8,0
7	Vor der Hydrolyse	5	1 „	0,0186	0,0093	50,0	—	—
8	Hydrolyse 3 Stunden	5	1 „	0,0547	0,0268	49,0	—	2,0
	Leucyl-glycin:							
9	Vor der Hydrolyse	10	neutr.	0,1496	0,0741	49,6	—	—
10	Hydrolyse 3 Stunden	10	„	0,0689	0,0297	43,1	—	13,8
11	„ 4 „	10	„	0,0687	0,0275	40,0	—	20,0
12	„ 3 „	10	**1 Proz.**	0,0670	0,0437	**65,2**	30,4	—
13	„ 3 „	20	0,5 „	0,0819	0,0125	15,3	—	69,4
14	„ 4 „	20	0,5 „	0,0770	0,0114	14,8	—	70,4
15	„ 4 „	50	neutr.	0,2693	0,0209	7,8	—	84,4
	Phenyl-alanyl-alanin:							
16	Vor der Hydrolyse	10	neutr.	0,1187	0,0597	50,3	—	—
17	Hydrolyse 3 Stunden	20	„	0,0894	0,0	0,0	—	100,0
18	„ 3 „	10	1 Proz.	0,0510	0,0279	54,7	9,4	—
19	„ 3 „	10	5 „	0,0615	0,0501	81,5	63,0	—
	Phenyl-alanyl-alanin + Aminosäuren:							
20	Vor der Hydrolyse	20	—	0,1256	0,0956	76,1	—	—
	Nach der Hydrolyse	20	neutr.	0,1107	0,0627	56,6	—	100 + 20

Tabelle II. Hydrolyse der Anhydride.

Nr.	Versuchsbedingungen	Konzentration Anhydrid Proz.	Konzentration Säure Proz.	Gesamt-N g	Amino-N g	Proz. Amino-N vom Gesamt-N	Proz. des Zerfalls
	Glycinanhydrid:						
21	Vor der Hydrolyse	10	1	0,1205	0,0	0,0	—
22	Hydrolyse 3 Stunden	10	1	0,1214	0,1133	94,8	94,8
23	Vor der Hydrolyse	10	1	0,1205	0,0	0,0	—
24	Hydrolyse 2 Stunden	10	1	0,1095	0,0677	61,8	61,8
25	Vor der Hydrolyse	10	1	0,1205	0,0	0,0	—
26	Hydrolyse 1 Stunde	10	1	0,1212	0,0523	43,2	43,2
	Alaninanhydrid:						
27	Vor der Hydrolyse	10	1	0,0525	0,0	0,0	—
28	Hydrolyse 3 Stunden	10	1	0,1969	0,1031	52,4	52,4
29	Vor der Hydrolyse	10	1	0,0946	0,0	0,0	—
30	Hydrolyse 2 Stunden	10	1	0,0749	0,0276	36,9	36,9
	Leucyl-glycinanhydrid:						
31	Vor der Hydrolyse	10	1	0,0793	0,0	0,0	—
32	Hydrolyse 3 Stunden	10	1	0,0793	0,0307	38,7	38,7
33	Vor der Hydrolyse	10	5	0,0793	0,0	0,0	—
34	Hydrolyse 2 Stunden	10	5	0,0818	0,0763	93,4	93,4
	Phenyl-alanyl-alaninanhydrid:						
35	Vor der Hydrolyse	10	neutr.	—	0,0	0,0	—
36	Hydrolyse 3 Stunden . . .	10	1	0,0599	0,0243	40,5	40,5

Tabelle III.

Nr.	Hydrolyse	Konzentration		Gesamt-N	In der Lösung			Im Niederschlag		Anhydrid nach dem Niederschlag
	Stunden	Peptid Proz.	Säure	g	Gesamt-N g	Amino-N g	Proz. NH_2-N vom Gesamt-N	Gesamt-N g	Amino-N g	Proz.
10	3	10	neutr.	0,0689	0,0618	0,0297	48,0	0,0071	0,0	10,3
11	4	10	"	0,0687	0,0510	0,0275	53,9	0,0177	0,0	25,8
13	3	20	0,5 Proz.	0,0819	0,C330	0,0125	38,0	0,0489	0,0	59,7
14	4	20	0,5 "	0,0770	0,0306	0,0114	37,3	0,0463	0,0	60,3

alanins zur Anhydrisierung kann, wie es scheint, die Anhydrisierung in einem Gemisch von Aminosäuren katalysieren.

Dieses Peptid wurde in wässeriger Lösung mit Aminosäuren, und zwar mit Glykokoll, Alanin, Phenyl-alanin und Leucin hydrolysiert. Es waren vor der Hydrolyse: Gesamtstickstoffgehalt 0,1256 g, an Amino-N 0,0956 g, wovon auf den Amino-N des Peptids 0,0168 g kommen. Nach der Hydrolyse blieben 0,0627 g Amino-N, d. h. die Anhydrisierung nahm nicht nur den Amino-N des Peptids in Anspruch, sondern auch 0,0161 g Amino-N der Aminosäuren, etwa 20 Proz. derselben. Diese Erscheinung muß eingehend studiert werden, da solch eine katalytische Anhydrisierung, falls sie Bestätigung finden wird, mit der katalytischen Synthese von Anhydriden oder Dipeptiden aus Aminosäuren zu vergleichen wäre.

Phenyl-alanyl-alaninanhydrid wird durch 1 proz. HCl im Laufe von 3 Stunden bis zu 40 Proz. hydrolysiert.

Lediglich auf Grund des Verhaltens des Amino-N zum Gesamt-N vor und nach der Hydrolyse können wir freilich nicht mit Sicherheit behaupten, daß das Steigen oder Sinken dieses Verhaltens nur auf den Grad des Zerfalls oder die Anhydrisierung hinweist. Es ist möglich, daß zwei Prozesse vor sich gehen, die, aufeinander folgend, keine Möglichkeit geben, jeden dieser Prozesse nach der Änderung dieses Verhaltens zu beurteilen.

Beim Leucyl-glycin versuchten wir, der Frage näherzutreten, indem wir sowohl den bei der Hydrolyse entstehenden Niederschlag (Anhydrid) als auch die Lösung untersuchten. Zu diesem Behuf wurde der Niederschlag quantitativ abfiltriert, gewaschen und in heißem Wasser gelöst. Der Amino- und Gesamt-N wurden sowohl

im Niederschlag als im Filtrat bestimmt. Diese Versuche (Tabelle III) erbrachten den Beweis, daß wir mit genügender Annäherung auf Grund der Änderung des Aminoverhaltens den Charakter des Prozesses beurteilen können, ohne das gebildete Anhydrid als solches auszuscheiden.

In der Lösung bleibt eine geringe Anhydridmenge. In saurer Lösung bleibt mehr als in neutraler; aus der Tabelle III ist aber zu ersehen, daß die parallel vor sich gehende Hydrolyse des Dipeptids so gering ist, daß sie den Hauptprozeß der Anhydrisierung in keiner Weise verdunkelt.

1,8 g reinen Leucyl-glycins wurden im zugeschmolzenen Rohre im Laufe von 3 Stunden im Autoklaven auf 180° erhitzt. Das schwach gelbe Reaktionsprodukt wurde unter Erwärmen in Wasser gelöst, die Lösung abgekühlt und das ausgeschiedene Anhydrid abfiltriert, gewaschen und getrocknet: Amino-N wurde nicht aufgefunden. Die Mutterlauge enthielt Gesamt-N 0,0831 g, Amino-N 0,0286 g; Verhalten des Amino- zum Gesamt-N = 34,4 Proz. Von den 0,1341 g Amino-N gingen in die Anhydridbildung 21,3 Proz. nicht ein. Das Anhydrid schmolz bei 245°. Stickstoff wurde gefunden 16,41 Proz. (Theorie 16,47 Proz.).

Schlußfolgerungen.

Bei der Autoklavenhydrolyse der Anhydride mittels verdünnter Säuren findet ein größerer oder geringerer Zerfall derselben statt. Je höher in der homologen Reihe die das Anhydrid bildende Aminosäure, desto schwerer geht die Hydrolyse des Anhydrids.

Erhöhung der Säurekonzentration beschleunigt die Hydrolyse der Anhydride.

Bei der Hydrolyse der wässerigen Lösungen von Dipeptiden findet Anhydrisierung derselben statt.

Je größer die Molekel der Dipeptide, desto leichter geht deren Anhydrisierung.

Die Konzentrationserhöhung der wässerigen Lösung des Dipeptids steigert die Anhydrisierung.

Schwach saures Milieu verhindert die Anhydrisierung und hebt sie bei molaren Konzentrationen ganz auf.

Bei der Autoklavenhydrolyse von Proteinen ist eine Anhydrisierung auf Kosten der gebildeten Peptide nicht zu erwarten, falls die Säuremenge so berechnet wird, daß Mol pro Mol Eiweißstickstoff auskommt. Bei solch einer Hydrolyse zerfällt schon ein Teil der in den Proteinen vorhandenen Anhydride.

Dieser Zerfall muß besonders leicht bei Anhydriden gehen, die aus Aminosäuren mit geringem Molargewicht entstanden sind. Unter

den Zerfallsprodukten des Eiweißes ist Glycinanhydrid (Diketopiperazin), so viel wir wissen, nicht gefunden.

In saurer Lösung geht der Zerfall der Anhydride, wie es scheint, nicht über die Dipeptide; das System besteht nur aus zwei Komponenten: Anhydrid und Aminosäure.

In neutralen Lösungen dagegen bilden die Peptide das System: Dipeptid-Anhydrid und in sauren Lösungen: Dipeptid-Aminosäure.

Das Studium der gemeinschaftlichen Existenz und des Gleichgewichts dieser Systeme ist nicht nur im Interesse der Klärung der einen oder anderen Methode der Eiweißhydrolyse erforderlich, sondern ist auch von hoher biologischer Bedeutung.

Literatur.

1) Diese Zeitschr. **136**, 241, 1923; **147**, 30, 1924. — 2) Berl. Ber. **56**, 1887, 1923. — 3) Zeitschr. f. physiol. Chem. **134**, 121, 147; **136**, 219, 1924. — 4) Ebenda **141**, 100, 1924.

Beiträge zur Dynamik der Autoklavenhydrolyse der Eiweißstoffe (Methode von Zelinsky-Ssadikow) mittels verdünnter Säuren.

Von

N. J. Gawrilow, E. Stachejewa, A. Titowa und N. Ewergetowa.

(Aus dem organisch-chemischen Laboratorium der I. Universität Moskau.)

(Eingegangen am 4. Januar 1927.)

Beim Studium der allmählichen Änderung der Menge des Aminostickstoffs in den Eiweißhydrolysaten kann man Hinweise auf den Hauptprozeß der sich abspielenden Reaktion erwarten, d. h. darauf, ob die Hydrolyse bis zu dem einen oder anderen Zerfallsstadium des Eiweißes vor sich geht, oder ob in einem bestimmten Moment, namentlich dann, wenn die Eiweißstoffe größtenteils in einfache Peptide verwandelt und abiuret wurden, die Bildung von Anhydriden eintritt, wie das mit Rücksicht auf das Verhalten von reinen Dipeptiden (1) bei ihrer Hydrolyse im Autoklaven unter gewissen Bedingungen zu erwarten wäre.

In bezug auf Gelatine, Pepton und Sturinsulfat läßt sich die Frage mit Bestimmtheit derart beantworten, daß im Autoklaven beim Erwärmen nicht nur mit verdünnten Säuren, sondern auch mit Wasser in Abwesenheit von letzteren Hydrolysate entstehen, in denen sich (in verschiedenen Zerfallsstadien) kein Sinken des Aminostickstoffs, also auch keine merkliche Anhydridbildung, beobachten läßt. Nur die abiurete Lösung von Produkten der Albuminspaltung in neutralem oder schwach saurem Milieu gab bis zu 10 Proz. Verminderung des Aminostickstoffs.

Die Hydrolysate des Albumins, Caseins und Gliadins gaben nach sechsstündiger Hydrolyse mit schwacher Säure, also nach erreichter Zerfallsgrenze, beim weiteren Erwärmen keine Verminderung ihres Aminostickstoffs.

Das Sturinsulfat wurde nach *Kossel* durch Extraktion mittels verdünnter Schwefelsäure, der mit Alkohol getrockneten und mittels Petroläther entfetteten Testikel des Störs und darauf folgende Fällung des Extrakts mit Alkohol gewonnen. Die Reinigung geschah durch wiederholte Auflösung in Wasser und Fällung mit Alkohol.

Das Eieralbumin war das des Handels.

Das Handelscasein war das nach *Hammarsten* bereitete.

Das Gliadin wurde, wie üblich, aus Weizenmehl durch Extraktion mit wässerigem Alkohol gewonnen.

Das Albuminhydrolysat wurde durch Hydrolyse des Eieralbumins mittels 25proz. Schwefelsäure bis zur Abiuretreaktion gewonnen. Nach Entfernung der Schwefelsäure, Filtrieren, Entfärbung mittels Kohle wurde das Hydrolysat im Vakuum eingeengt. Während dieser Operation fiel eine bedeutende Menge von Tyrosin aus.

Das Handelspepton, siccum, wurde mit Trypsin hydrolysiert, und zwar im Thermostaten in soda-alkalischer Lösung. Die Biuretreaktion war positiv.

Das fermentative Gelatinehydrolysat wurde für die Versuche 76 bis 81 durch Einwirkung von Pepsin (Pepsinum Ph. Rossicum) in 0,1 proz. Salzsäure auf eine 20proz. Lösung von Gelatine gewonnen.

Für die Versuche 82 bis 87 wurde das aus Gelatine durch 60stündige Einwirkung von Trypsin (*Kahlbaum*) gewonnene Hydrolysat genommen. Diese Lösung wurde für die Versuche 88 bis 93 noch 60 Stunden der Einwirkung des Trypsins überlassen. Das gewonnene Hydrolysat wurde für die Versuche 94 bis 98 abfiltriert und im Vakuum bis zur Hälfte des Volumens eingeengt.

Die Bestimmung des Aminostickstoffs wurde nach der Methode von *Sörensen* ausgeführt. Eine Abänderung bestand darin, daß die anfängliche Neutralisation nicht auf Lackmus eingestellt wurde, sondern auf Neutralrot, das direkt zu der zu untersuchenden Lösung zugegeben wird. In Fällen, wo die Färbung der Lösung die Anwendung von Neutralrot unmöglich machte, wurde die Titration mittels eines empfindlichen Lackmuspapierchens geführt.

Gelatine.

Für die Versuche (Tabelle I, Serie 1 und 2) wurde eine Lösung von 10 Proz. Gelatine in 1,1 proz. Schwefelsäure genommen. Für die dritte Serie wurde eine 20proz. Gelatinelösung mit der entsprechenden Lösung von Säure und Wasser mit solcher Berechnung verdünnt, daß eine 10proz. Lösung in Säuren verschiedener Konzentration entstehe.

Nach stattgehabter Hydrolyse wurde die Lösung im Meßkolben auf bestimmtes Volumen gebracht und dann der Gesamt- und Aminostickstoff bestimmt. Nach vollständiger Hydrolyse soll die Gelatine etwa 88 Proz. Aminostickstoff enthalten (2). Die Hydrolyse geschah im Autoklaven bei verschiedenen Temperaturen (erste Serie der Versuche) und bei 180° (zweite Versuchsserie.)

Der Versuch Nr. 8 der zweiten Serie wurde derart ausgeführt, daß der Aminostickstoff nach dem Erkalten der Lösung bestimmt wurde,

gleich nachdem die Temperatur im Autoklaven auf 180° stieg. Somit dauerte die Hydrolyse bei 180° 1 bis 2 Minuten, und ist die ganze Steigerung des Gehalts an Aminostickstoff der kurzzeitigen Hydrolyse zuzuschreiben, die bei niedrigeren Temperaturen vonstatten geht, sobald die Temperatur die erwähnte Grenze erreichte.

Die Erwärmung des Autoklaven mit den darin befindlichen zugeschmolzenen Röhrchen samt den zu hydrolysierenden Flüssigkeiten geschah in allen Versuchen derart, daß die Temperatur erst nach 45 Minuten auf 180° stieg; die Erkaltung des Autoklaven bis auf 100°, wonach der Autoklav geöffnet wurde, dauerte 25 Minuten.

Zur Bestimmung des Gesamt- und Aminostickstoffs wurden je 20 ccm der Hydrolysate genommen. In jedem Röhrchen wurden 20 ccm Gelatinelösung hydrolysiert.

Aus der Tabelle I lassen sich folgende Schlüsse ziehen: 1. Bei der Autoklavenhydrolyse der Gelatine läßt sich sowohl in Abhängigkeit von der Zeit als in Abhängigkeit von der Temperatur und der Säure-

Tabelle I.

Serie 1. 10proz. Lösung von Gelatine in 1,1proz. Schwefelsäure. Einfluß der Temperatur bei zweistündiger Erwärmung.

Versuch Nr.	Temperatur °C	Gesamt-N g	Amino-N g	Amino-N zum Gesamt-N Proz.	Biuretreaktion
1	100	0,0370	0,0021	5,7	+
2	120	0,0392	0,0045	11,5	+
3	140	0,0386	0,0058	15,0	+
4	160	0,0391	0,0116	29,7	schwach
5	180	0,0390	0,0132	32,8	„
6	200	0,0364	0,0131	36,0	—

Serie 2. 10proz. Lösung von Gelatine in 1,1proz. Schwefelsäure bei 180°. Einfluß der Zeit.

Versuch Nr.	Versuchsdauer	Gesamt-N g	Amino-N g	Amino-N zum Gesamt-N Proz.	Biuretreaktion
7	—	0,0449	0,0083	18,5	+
8	0h20′	0,0449	0,0105	23,4	+
9	0 40	0,0449	0,0105	23,4	+
10	1	0,0421	0,0119	28,2	+
11	1 20	0,0421	0,0126	29,8	+
12	1 40	0,0421	0,0126	29,8	+
13	2 20	0,0421	0,0128	30,3	sehr schwach
14	2 40	0,0421	0,0128	30,3	„ „
15	3	0,0421	0,0144	34,2	—
16	6	0,0397	0,0205	42,1	—
17	9	0,0350	0,0197	51,7	—
18	12	0,0340	0,0189	56,0	—
19	24	0,0397	0,0205	55,6	—

Serie 3. 10proz. Lösung in Schwefelsäure verschiedener Konzentration 2 Stunden bei 180°. Einfluß der Säurekonzentration.

Versuch Nr.	Säurekonzentration Proz.	Amino-N zum Gesamt-N Proz.	Biuretreaktion
20	0,01	13,4	+
21	0,02	13,4	+
22	0,1	13,6	+
23	0,2	14,3	+
24	0,4	17,8	+
25	0,8	24,5	+
26	1,0	26,9	+
27	1,2	32,9	+
28	1,5	32,3	+
29	1,8	33,7	schwach
30	2,0	35,8	sehr schwach
31	10,0	72,3	—
32	20,0	70,3	—

konzentration ein Moment beobachten, in dem wiederum über 30 Proz. des Gesamtstickstoffs aus dem gebundenen Peptidzustand in solchen übergehen, der sich nach *Sörensen* titrieren läßt. In diesem Moment verschwindet die Biuretreaktion und die Hydrolyse geht bei weiterem Erwärmen oder Temperaturerhöhung schon mit großer Mühe. Es ist anzunehmen, daß in der Gelatine etwa 30 Proz. Stickstoff derart gebunden sind, daß er bei der Hydrolyse in die Aminogruppe leicht übergeht (in Polypeptidbindung oder in Form eines leicht hydrolysierbaren Ringes des Glycinanhydrids).

2. Der Zeitverlauf der Hydrolyse gestaltet sich derart, daß schon während der anfänglichen Hydrolyse bis 30 Proz. Aminostickstoff in 1 Stunde frei gemacht werden. Die weitere Erwärmung im Laufe von 2 Stunden steigert die Menge des Aminostickstoffs nur um 5 Proz. Nach zehnstündiger Hydrolyse bleibt die Menge des Aminostickstoffs konstant.

3. Der Gang der Hydrolyse wird durch die Säurekonzentration stark beeinflußt, indem die Hydrolyse mit steigender Konzentration scharfe Unterschiede gegenüber der Hydrolyse mit schwacher Säure aufweist. Die Hydrolyse geht allmählich und erreicht bis 70 Proz. N in Form von Aminogruppen (zweistündige Erwärmung bei 180° mit 10- und 20proz. Schwefelsäure).

4. Die Intensität der Hydrolyse wird durch die Temperatur sehr beeinflußt, indem die Menge der freien Aminogruppen bei 180° sechsmal größer wird, als bei 100°.

5. Es ist anzunehmen, daß die Polypeptidbindung in der Gelatine bei der Erwärmung mit 1proz. Schwefelsäure bei 180° im Laufe von

3 Stunden vollständig hydrolysiert wird. Wie aus den Versuchen der zweiten Serie zu ersehen ist, enthält die Gelatinemolekel mindestens 50 Proz. anhydridartig gebundenen Aminostickstoffs.

Sturinsulfat.

Hier wurde die Hydrolyse bei verschiedener Konzentration sowohl des Proteins als der Säure geführt, und zwar in zugeschmolzenen Röhrchen bei 180° im Laufe von 3 Stunden. Nach der Hydrolyse wurde das Hydrolysat (Nr. 39) titriert, während Nr. 40 und 41 behufs Entfernung der Schwefelsäure mit einem sehr geringen Überschuß von Bariumcarbonat neutralisiert wurden. Die Reaktion war schwach alkalisch. Die Röhrchen wurden zugeschmolzen und nochmals 3 Stunden auf 180° erwärmt. Nach dem Öffnen der Röhrchen wurden deutlicher Ammoniakgeruch und stark alkalische Reaktionen wahrgenommen.

Tabelle II.

Serie 4. Hydrolyse des Sturinsulfats. Einfluß der Eiweiß- und Säurekonzentration.

Versuch Nr.	Bedingungen der Hydrolyse	Eiweiß-konzentration Proz.	Säure-konzentration Proz.	Gesamt-N g	NH_2-N g	NH_2-N zum Gesamt-N Proz.
33	Vor der Hydrolyse	—	—	0,0360	0,00358	10,0
34	Hydrolyse 3 Stdn.	10	neutral	0,0360	0,0144	40,0
35	Ebenfalls	10	$2^1/_2$	0,0794	0,0297	37,4
36	"	10	5	0,0902	0,0366	40,6
37	"	10	10	0,0910	0,0438	48,1
38	"	10	20	0,1764	0,0920	52,1
39	"	20	$2^1/_2$	0,1605	0,0291	18,2
40	Nach 3 stünd. Hydrolyse zugesetzt etwas über theoret. Menge $BaCO_3$, a. alle H_2SO_4 berechn. u. 3 Stdn. im Autoklaven erwärmt	20	alkalisch	0,1843	0,1473	80,0
41	Dasselbe	20	"	0,1613	0,1379	85,4

Aus diesen Versuchen kann man den Schluß ziehen, daß das Sturin keine Anhydridbindungen enthält, oder daß die Anhydride leicht hydrolysiert werden. Nach *Kossel* beträgt die Menge des im Sturin enthaltenen und mit Formol titrierbaren Stickstoffs im Verhältnis zum Gesamtstickstoff 55 Proz. Bei sechsstündigem Erwärmen des Sturinsulfats im Autoklaven mit 2½proz. H_2SO_4 bei 180° (Versuch 59, Tabelle III) wird fast aller titrierbarer Stickstoff frei.

Das weitere Erwärmen im Autoklaven des schon hydrolysierten, von H_2SO_4 befreiten Sturins, in schwach alkalischem Medium ($BaCO_3$) führt zum tiefen Zerfall der dasselbe zusammensetzenden Aminosäuren und zur Ausscheidung von NH_3 (offenbar Arginin-NH_3).

Albumin, Casein, Gliadin, Sturin-Sulfat.

Die Hydrolyse dieser Serie wurde im Autoklaven in zugeschmolzenen Röhrchen geführt, und zwar in den Versuchen 42 bis 56 mit 2proz. Salzsäure, und in den Versuchen 57 bis 61 mit $2\frac{1}{2}$proz. H_2SO_4.

Zur abgewogenen Menge des Proteins wurde die Säure zugesetzt.

In den Versuchen 57 bis 61 wurde das Hydrolysat filtriert; der Niederschlag auf dem Filter wurde zur vollständigen Beseitigung der H_2SO_4 mit Wasser gewaschen und das Filtrat in einem Meßkolben auf ein bestimmtes Volumen gebracht. Durch das Verbrennen des Filters mit Schwefelsäure und Abtreiben des Ammoniaks überzeugten wir uns, daß der Niederschlag nur Spuren von Stickstoff enthält.

Das Filtrat wurde mit Formol titriert. In den Versuchen 57 bis 61 wurde ohne Filtration direkt titriert.

Die chemische Beschaffenheit des entstehenden Niederschlags blieb uns unbekannt; aber die Menge des letzteren sank in allen Versuchsserien proportional der Zeit und der Temperatur.

Die Versuchsergebnisse der Serie 5 beweisen, daß bei den untersuchten Proteinen, wie auch zu erwarten war, der Gehalt an der leicht beweglichen Polypeptidbindung bedeutend größer ist als an der An-

Tabelle III.

Serie 5. Hydrolyse verschiedener Proteine bei 180°.

Versuch Nr.	Dauer der Hydrolyse Stunden	Gesamt-N g	Amino-N g	Verhältnis des Amino-N zum Gesamt-N Proz.
	10proz. Lösung von Albumin in 2proz. Salzsäure.			
42	1	0,1451	0,0608	41,9
43	2	0,1451	0,0619	42,7
44	3	0,1451	0,0655	45,2
45	6	0,1451	0,0662	45,7
46	9	0,1451	0,0665	45,9
	10proz. Lösung von Casein in 2proz. Salzsäure.			
47	1	0,1420	0,0584	41,1
48	2	0,1420	0,0648	45,6
49	3	0,1420	0,0651	45,9
50	6	0,1420	0,0716	50,4
51	9	0,1420	0,0732	51,5
	10proz. Lösung von Gliadin in 2proz. Salzsäure.			
52	1	0,1482	0,0709	47,9
53	2	0,1482	0,0725	49,0
54	3	0,1482	0,0728	49,2
55	6	0,1482	0,0733	49,5
56	9	0,1482	0,0759	51,2
	10proz. Lösung von Sturinsulfat in $2^1/_2$proz. H_2SO_4.			
57	2	0,0830	0,0275	33,1
58	3	0,0794	0,0297	37,4
59	6	0,0793	0,0393	49,6
60	9	0,0836	0,0423	50,6
61	12	0,0794	0,0412	51,9

hydridbindung. Letztere ist besonders wenig im Sturin enthalten, in dem nach zwölfstündigem Erwärmen die Menge des Aminostickstoffs der aus den Zerfallsprodukten theoretisch berechneten nahe kommt. Ein großer Teil des im Gliadin mit Formol titrierbaren Stickstoffs ist dem Ammoniak zuzuschreiben, das durch die Hydrolyse der Amidogruppe des Glutamins und Asparagins, welch letztere nach *Osborne* u. a. im Gliadin enthalten sind, entsteht.

Die Autoklavenhydrolyse der gewöhnlichen Proteinhydrolysate.

Albuminhydrolysat.

Das Eieralbumin wurde mit 25proz. Schwefelsäure bis zur abiureten Reaktion hydrolysiert. Nach Entfernung der Schwefelsäure mittels $BaCO_3$ wurde die Lösung mit Kohle bearbeitet, gekocht und das Filtrat im Vakuum eingeengt. Die Konzentration des hydrolysierten Proteins wurde nach dem Gehalt an Gesamtstickstoff multipliziert mit 6,25 bestimmt. In den Versuchen 65 bis 68 wurden 5 ccm des Hydrolysats mit der entsprechenden Menge Wasser und Säure bis auf 10 ccm verdünnt. Die Hydrolyse wurde in zugeschmolzenen Röhrchen im Autoklaven 3 Stunden bei 180° ausgeführt.

Das während der Hydrolyse ausgeschiedene Tyrosin und eine kleine Menge von uns näher nicht untersuchte Aminosäure wurden abfiltriert.

Tabelle IV.

Serie 6. Autoklavenhydrolyse des vorher mittels Schwefelsäure hydrolysierten Albumins.

Versuch Nr.	Versuchsbedingungen	Konzentration		Gesamt-N	Amino-N	Amino-N zu Gesamt-N
		des Proteins Proz.	der Säure Proz.	g	g	Proz.
62	Vor der Autoklavenhydrolyse	20	neutral	0,1645	0,1196	72,7
63	Hydrolyse 3 Stdn.	20	„	0,1645	0,1129	68,7
64	Ebenfalls	10	„	0,1645	0,1196	72,7
65	„	10	„	0,0850	0,0657	77,3
66	„	10	1	0,0846	0,0534	63,1
67	„	10	5	0,0846	0,0781	92,3
68	„	10	1	0,0846	0,0483	57,0

Bei der Hydrolyse des Albuminhydrolysats in schwach saurer oder neutraler Lösung ist eine Neigung zur Verringerung des Gehalts an Aminostickstoff zu merken, und zwar wahrscheinlich infolge einer Peptisation. Konzentriertere Säuren haben weiteren Zerfall zur Folge.

Trypsinhydrolysat des Peptons.

Das Pepton wurde in soda-alkalischer Lösung mittels Trypsin *(Kahlbaum)* hydrolysiert. Die Biuretreaktion war positiv. Das

filtrierte, fermentative Hydrolysat wurde in Röhrchen mit Wasser und Schwefelsäure bis auf ein bestimmtes Volumen verdünnt. Sämtliche Lösungen sind dunkel gefärbt, was die Titration erschwerte.

Tabelle V. Serie 7.

Versuch Nr.	Versuchsbedingungen	Konzentration des Proteins Proz.	Konzentration der Säure Proz.	Gesamt-N g	Amino-N g	Amino-N zu Gesamt-N Proz.
69	Pepton vor der Trypsinhydrolyse	16	neutral	0,1263	0,0141	11,21
70	Nach der Trypsinhydrolyse	15	"	0,1196	0,0590	49,34
71	Autoklavenhydrolyse	15	"	0,1196	0,0745	62,31
72	Ebenfalls	7,5	"	0,0598	0,0398	66,50
73	"	7,5	1	0,0598	0,0397	66,34
74	"	7,5	5	0,0598	0,0541	90.50

Pepsin- und Trypsinhydrolysat der Gelatine.

Für die Versuche 75 bis 81 wurde eine 10- bis 20proz. Gelatinelösung mit Pepsin hydrolysiert. Das Pepsinhydrolysat wurde mit Soda alkalisch gemacht und für die Versuche 82 bis 87 im Thermostaten 60 Stunden, für die Versuche 85 bis 95 bis 120 Stunden mit Trypsin weiter hydrolysiert. Dasselbe wurde für die Versuche 91 bis 95 nach der Hydrolyse neutralisiert und im Vakuum bis zur Hälfte des ursprünglichen Volumens eingeengt. Die Menge des Proteins in der Lösung wurde nach dem Gesamtstickstoff multipliziert mit 6,25 bestimmt. Alle Hydrolysate wiesen die Biuretreaktion auf. Die Autoklavenhydrolyse wurde mittels Schwefelsäure bei 180^0 geführt.

Aus den Tabellen V und VI kann man folgende Schlüsse ziehen:

1. Bei der Autoklavenhydrolyse des fermentativen Hydrolysats ist nirgends eine Verminderung des Aminostickstoffs (Anhydrisierung) zu merken.

2. Die fermentativen Hydrolysate lassen sich viel leichter und weiter hydrolysieren als die Säurehydrolysate und die genuinen Proteine. Je tiefer die fermentative Hydrolyse vor sich ging, desto leichter geht alsdann auch die Hydrolyse mittels schwacher Säuren. Es ist möglich, daß bei der fermentativen Hydrolyse besonders in alkalischem Milieu nicht nur ein Zerfall der Polypeptidbindung stattfindet, sondern auch der Anhydridbindung (3). Dann werden die aufgeschlossenen Anhydride leichter und bis zu Ende durch Säuren hydrolysiert.

Während Gelatine nach der Hydrolyse mit 20proz. Schwefelsäure im Autoklaven bei Versuch 32 nur 70 Proz. Aminostickstoff in der Lösung des Hydrolysats enthält, läßt sich dieselbe Gelatine, mit

Tabelle VI.

Serie 8. Hydrolyse der mittels Pepsin- bzw. Trypsin verdauten Gelatine.

Versuch Nr.	Versuchsbedingungen	Konzentration des Proteins Proz.	Konzentration der Säure Proz.	Gesamt-N g	Amino-N g	Amino-N zu Gesamt-N Proz.
75	Gelatine vor der Pepsinhydrolyse	13	neutral	0,1049	0,0045	4,3
76	N. d. Pepsinhydrolyse	13	0,1	0,1049	0,0052	5,0
77	Nach d. Autoklavenhydrolyse 3 Stdn.	13	neutral	0,1049	0,0209	19,9
78	Ebenfalls	6,6	"	0,0525	0,0103	19,7
79	"	6,6	1	0,0525	0,0151	28,8
80	"	6,6	5	0,0525	0,0324	61,8
81	N. d. Trypsinhydrolyse v. Nr. 76 60 Std.	13	neutral	0,1050	0,0206	19,6
82	Autoklavenhydrolyse von Nr. 81	13	"	0,1050	0,0420	40,0
83	Ebenfalls	6,6	"	0,0525	0,0223	42,4
84	"	6,6	1	0,0525	0,0273	50,8
85	N. d. Trypsinhydrolyse v. Nr. 81 60 Std.	14	neutral	0,1108	0,0306	27,6
86	Autoklavenhydrolyse von Nr. 85	14	"	0,1108	0,0324	27,9
87	Ebenfalls	7	"	0,0554	0,0174	31,4
88	"	7	1	0,0554	0,0231	41,7
89	"	7	5	0,0554	0,0414	74,7
90	"	7	10	0,0554	0,0444	80,1
91	Hydrolysat Nr. 85 im Vakuum bis 1/2 Vol. konzentriert	24	neutral	0,0487	0,0171	35,2
92	Hydrolysat Nr. 91 im Autoklaven	24	"	0,0973	0,0412	42,3
93	Ebenfalls	12	"	0,0487	0,0226	46,5
94	"	12	1	0,0487	0,0253	52,0
95	"	12	10	0,0487	0,0451	92,7

einem Gehalt von 27,6 Proz. Amino-N nach vorheriger Bearbeitung mit Trypsin, mit 10proz. H_2SO_4 im Autoklaven, Versuch 90, bis auf einen Gehalt von 80,1 Proz. mit Formol titrierbaren Stickstoffs hydrolysieren.

Da Gelatine theoretisch nur etwa 88 Proz. Amino-N als titrierbare Aminosäuren enthält, so kann solch eine bedeutende Steigerung dieser Form des Stickstoffs einer vorherigen tiefen Veränderung der Eiweißmolekel unter dem Einfluß der fermentativen Hydrolyse im alkalischen Medium zugeschrieben werden.

Literatur.

1) *Brigl*, B. **56**, 1887, 1923; *Abderhalden* und *Komm*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **188**, 121; **189**, 147, 1924. — 2) *Kossel*, Die Naturwissenschaften **10**, 1000, 1922. — 3) *Abderhalden* und *Goto*, Fermentforschung **7**, 169, 1923; *Waldschmidt-Leitz* und *A. Schäffner*, Berl. Ber. **58**, 1356, 1925.

Proteinogene Toxikosen.

Von

Leon A. Tscherkes.

(Aus der Morphologischen und Physiologischen Abteilung des Forschungsinstituts und aus dem Laboratorium für Allgemeine Pathologie am Staatlichen Chemisch-Pharmazeutischen Institut zu Odessa.)

(Eingegangen am 7. Januar 1927.)

Mit 1 Abbildung im Text.

Beim Studium der Rolle, welche verschiedenen organischen Nährstoffen bei der Ausbildung avitaminöser Zustände zukommt, konnten wir in einer unserer früheren Mitteilungen (1) feststellen, daß mit der Vergrößerung des Proteinanteils der Diät der Verlauf der B-Avitaminose bei Tauben beschleunigt wird.

Funk, Dubin und *Paton* (2) (3) sind währenddessen zu einer entgegengesetzten Schlußfolgerung gelangt und schreiben dem Eiweiß Vitamin-B-sparende Eigenschaften zu. Im gleichen Sinne hat sich auch *Abderhalden* (4) ausgesprochen, dem es gelang, mittels Zusatz von Casein zu poliertem Reis einem scharfen Fallen des Gewichts bei Tauben vorzubeugen. Es ist aber schon aus den Versuchen *Schaumanns* (5) bekannt, daß Zusatz von Hühnereiweiß zu poliertem Reis das Leben der Tiere kürzte, und *Eijkman* und *Hoogenhuyze* (6) haben darauf hingewiesen, daß Zusatz von Casein zur Reisdiät der Tauben (ohne gleichzeitige Steigerung der Vitamin-B-Verabreichung) weder die latente Periode, noch die Gewichtskurve beeinflußt. *Osborne* und *Mendel* (7) endlich fanden in ihren Versuchen ebenfalls keine Veranlassung, um den Eiweißen Vitamin-B-sparende Eigenschaften zuzuschreiben. *Asada* (8) und *Éderer* (9), die bei B-avitaminösen Ratten eine besondere Empfindlichkeit einseitiger Eiweißernährung gegenüber festgestellt haben, sind dadurch zu Resultaten gelangt, die mit den Ergebnissen unserer früheren Untersuchungen im Einklang stehen. Im gleichen Sinne wird die Frage auch durch die ganze interessante Serie der Arbeiten *Hartwells* (10) gelöst, in deren Versuchen eine Steigerung des Eiweißanteils in der Diät einer säugenden Ratte schädigend auf ihre Säuglinge wirkte;

dieser Schädigung konnte jedoch vorgebeugt werden, wenn man in die Diät der Mutter Produkte einführte, die an Vitamin B hinlänglich reich waren; dabei mußte die Quantität des zugegebenen Vitamins proportional der Steigerung der Eiweißmenge vergrößert werden. Die Ergebnisse der Versuche *Bonds* (11) entsprachen denjenigen der Beobachtungen *Hartwells*. Zur gleichen Faktenkategorie glauben *Drummond*, *Cowden* und *Hill* (12) die Resultate ihrer Experimente rechnen zu dürfen: sie beobachteten eine Wachstumsverzögerung bei Tieren, die eine eiweißreiche Diät erhielten, und nahmen an, daß diese Verzögerung von einer Störung des quantitativen Verhältnisses zwischen dem Proteingehalt der Nahrung und dem Vitamin B bedingt wurde.

Die weiteren Untersuchungen von *Tscherkes* (13) (14), deren Aufgabe es war, die Ursache der erwähnten Widersprüche aufzudecken, führten zu Schlüssen, die sich von denjenigen seiner obengenannten früheren Mitteilung nicht unterscheiden. *Funk*, *Collazo* und *Kaczmarek* (15) (16) unternahmen ebenfalls eine Prüfung derselben Widersprüche, unterwarfen die Frage einer neuen Revision, erklärten jedoch die früheren Schlußfolgerungen *Funks* über die vitamin-B-sparenden Eigenschaften des Eiweißes für unerschüttert. Gleichsinnig waren auch die Ergebnisse der Experimente von *Laviall* (17).

Während somit die einen Forscher glauben, daß das Eiweiß die Ausbildung der B-Avitaminose *erschwert*, sehen die anderen in ihm einen die B-Vitaminbedürfnisse *ökonomisierenden* Faktor, und die dritten endlich bewerten das Eiweiß als einen in dieser Hinsicht *indifferenten* Agenten. Alle diese wiederholt widersprechenden Beobachtungen zwangen uns, anzunehmen, daß die differenten Lösungen des Problems, welchem theoretische und praktische Bedeutung zukommt, mit irgend einem bisher nicht berücksichtigten Umstande im Zusammenhang stehen müssen. Um weiter im Studium des Problems vordringen zu können, erschien es uns als notwendig, in erster Linie die Frage zu beantworten, ob die bestehenden Widersprüche nicht durch die Bedeutung des *Eiweißes als solchen* bewirkt sein können, um so mehr, als die Frage von den toxischen Eigenschaften einer Diät mit prävalierendem Eiweißgehalt schon mehrmals aufgeworfen worden ist. Bei näherer Betrachtung dieser Frage stoßen wir auch hier wieder auf ein ganzes Gamma von gegensätzlichen Ergebnissen, ähnlich wie das bei der eben erfolgten Besprechung der Rolle des Eiweißes bei der B-Avitaminose der Fall war.

Während *Pflüger* (18) über Beobachtungen an einem Hunde berichtet, der einer ausschließlichen Fleischdiät unterworfen wurde und dabei gar keine sichtbaren Abweichungen von der Norm zeigte, konstatierte eine ganze Reihe von Forschern eine toxische Wirkung der Eiweiße, falls ihr Gehalt in der Diät stark prävalierte [*Watson* (19), *Maignon* (20) (21) u. a.]. Die Schlußfolgerungen dieser Autoren trafen auf Entgegnungen seitens späterer Untersucher, da in den von ihnen angewandten Nahrungsrationen die den Vitaminen zukommende Rolle nicht berücksichtigt worden ist. Und tatsächlich hatten *Osborne* und *Mendel* (22) (23), sowie auch *Polvogt*, *McCollum*

und *Simmonds* (24) eine normale Entwicklung junger Tiere bei eiweißreicher Diät beobachtet; sie hielten es sogar für zulässig, die Frage aufzustellen, ob eine Diät mit Vorwiegen von Eiweißen für wachsende Tiere nicht zuträglicher sei, als das von anderen Autoren angenommen wird [*Osborne* und *Mendel* (22, S. 162)]. *Drummond, Crowden* und *Hill* (12) und *Reader* und *Drummond* (25) beobachteten dagegen eine auffällige Wachstumsstörung bei Tieren, in deren Diät Proteine vorwogen, und bei *Asada* (8) gingen Ratten bei einseitiger Eiweißfütterung schon in der dritten bis vierten Woche zugrunde. Wir haben schon den toxischen Effekt erwähnt, mit welchem sich bei der Rattennachkommenschaft die Fütterung der säugenden Mutter mit einer an Eiweiß übermäßig reichen Ration äußert [*Hartwell* (10)]. Speziell hinsichtlich des Hühnereiweißes ist von *Harris* (26) und *Boas* (27) gezeigt worden, daß in Fällen, in welchen das Hühnerei-Eiweiß als einzige Quelle der Proteine der Diät erscheint, bei den Tieren eine Wachstumshemmung auftritt, die von Störungen im Haarwuchs begleitet wird. *Boas* (28) hat im weiteren endlich darauf hingewiesen, daß solche Störungen ausschließlich bei Fütterung mit dem käuflichen, getrockneten Eiweiß eintreten; bedient man sich dagegen nur frisch koagulierten Hühnerei-Eiweißes, so stellt sich die genannte Erscheinung nicht ein. Zur gleichen Faktenkategorie muß auch die experimentelle Amyloidose gerechnet werden, die mittels Fütterung der Tiere mit einer an Proteinen reichen Nahrung erzielt wird [*Kuczynski* (29)].

Daher verdient es einer besonderen Beachtung, daß bei den Japanern die Amyloidose, die sich im Prozeß chronischer Infektionen entwickelt, in so schwach ausgeprägter Form auftritt, daß sie gewöhnlich makroskopisch nicht festgestellt werden kann; sie kann nur mikroskopisch erkannt werden [*Motoki*, *Tanaka* (30)]. Diesen schwachen Äußerungsgrad der Amyloidose bringt *Tanaka* mit dem Vorwiegen einer an N-haltigen Substanzen armen pflanzlichen Kost (Reis) der Japaner in Verbindung. *Meyer* und *Wolf* (31) endlich haben Fälle von Amyloidose beschrieben, die ohne Grundkrankheit — allein bei Ernährung mit einer eiweißreichen Nahrung — auftrat.

Unsere Versuche führten wir an Tauben, weißen Ratten und weißen Mäusen aus.

In unseren früheren an Tauben angestellten Versuchen (13) (14) konnten wir feststellen, daß in Abwesenheit von Vitamin B die Anwendungsmöglichkeit des Prinzips des isokalorischen Ersatzes in bedeutendem Maße eingeschränkt ist; dieser Befund entsprach vollkommen jenen Ergebnissen, zu denen auch *Bickel* mit seinen Mitarbeitern gelangt ist (32). In unseren Versuchen gingen die B-avitaminösen Tauben in jenen Fällen früher zugrunde, in denen in der Diät Kohlehydrate oder Eiweiße prävalierten; am indifferentesten erwies sich das Fett. Bei einer in unserem Laboratorium von Dr. *Bergermann* und Dr. *Litwack* durchgeführten Reihe von Versuchen, bei welchen Tauben ebensolche isokalorische Gemische erhielten, konnten in An-

wesenheit von Vitamin B bei keinem einzigen der Tiere irgendwelche pathologischen Erscheinungen festgestellt werden. In jenen Versuchsserien, die gegenwärtig abgeschlossen sind, und über die an anderer Stelle mitgeteilt werden soll, war die Quantität der Proteine bis zu 61 Proz. des ganzen Bestandes der Diät erhoben worden (was 50 Proz. der ganzen Kalorienmenge ausmacht). Das Überwiegen der Eiweiße hat sich an den Versuchstieren in gar nichts geäußert und sie unterschieden sich sichtlich in nichts von solchen Tieren, deren Diät mehr Kohlehydrate oder Fette enthielt. In den genannten Bedingungen erwies sich also der *isokalorische Ersatz in Anwesenheit von Vitamin B als vollkommen durchführbar*. Versuche mit einer weiteren Steigerung des Eiweißgehalts der Diät, sowie mit ausschließlicher Eiweißernährung sind noch nicht abgeschlossen.

Eine andere Serie von Versuchen ist von Dr. *Kupermann* an weißen Ratten mittleren Alters (Gewicht 95 bis 169 g) ausgeführt worden. In Fällen, bei denen die Eiweißmenge (Casein) bis zu 50 Proz. gesteigert worden ist, konnten im Laufe einer 3 Monate anhaltenden Beobachtung gar keine pathologischen Veränderungen konstatiert werden. Die Fütterung der Ratten *ausschließlich* mit Casein führte nicht immer zu den gleichen Resultaten; doch konnten jedenfalls niemals Erscheinungen einer akuten Intoxikation beobachtet werden. Eine ausführliche Beschreibung dieser Versuche wird an anderer Stelle erscheinen.

Gänzlich anders waren die Ergebnisse, welche wir in unseren mit Dr. *Litwack* gemeinsamen Versuchen an *weißen Mäusen* erhielten. Alle Mäuse, die als Nahrung *ausschließlich Eiweiß* bekamen, gingen gewöhnlich am zweiten bis vierten Versuchstage unter Erscheinungen einer akuten Intoxikation zugrunde. In vielen Fällen überlebten die Mäuse die Dauer von 24 Stunden nicht, doch wurde auch eine fünf- bis siebentägige Lebensdauer beobachtet. Solche Tiere wurden träge und unsauber, ihr Fell wurde schmutzig und ballte sich zu Knäueln; darauf traten bei ihnen Lähmungen ein; die Tiere vermochten sich nur schwer von der Stelle zu bewegen, und oft konnte man sie auf der Seite liegen sehen. Nicht bei allen, jedoch in vielen Fällen wurden krampfhafte Zuckungen der Extremitäten wahrgenommen; seltener beobachteten wir auch allgemeine Krämpfe. Bei vielen Tieren konnte Verengung der Augenspalte und bei manchen Lidschluß konstatiert werden. Wiederholt wurde reichliches und oftes Harnlassen bemerkt. Die Exkremente waren von schwarzer Farbe. Dem Tode gingen gewöhnlich Atmungsstörungen voraus. Das Gewicht des Tieres sank. Es wurden verschiedene Eiweißarten und in verschiedener Zubereitungsform erprobt, die Resultate waren aber immer gleichartig. Sie sind in der Tabelle I zusammengestellt.

Tabelle I.

Tier Nr.	Eiweißart	Salzgemisch	Anzahl der *nach* Beginn des Versuchs verlebten Tage	Gewichtsverlust in Proz. des Anfangsgewichts
101	Hühnerei-Eiweiß (flüssig)	+	2	14
105		+	2	26
8	„ (trocken)	—	1	6
12	Durch Kochen koaguliertes frisches Hühnerei-Eiweiß	—	3	27,5
91		—	4	25
32		+	2	—
122		—	1	—
123		—	2	—
102	Pferdeblutserum (koaguliert)	+	1	12
108		+	1	26
7	Casein (nach *Hammarsten*)	—	1	24
92		—	4	27
100		+	2	28
110	Frischer Markt-Quark	—	6	41
116		—	4	20
1	Autoklavisierter Quark (trocken)	—	3	33*)
27		+	3	—
112	Autoklavisierter, vorher in Wasser aufgeweichter Quark	+	4	25
10	Gelatine	—	1	—
124		—	1	—
111	Edestin	+	2	29
125		+	2	—
113	Pepton (Fairchild Broasd Forsterd)	+	1	15
114		+	2	37

*) Erhielt alle Vitamine.

Wenn man dem Tier zu einer Zeit, wenn es noch zu fressen fähig ist, das Eiweiß durch eine gemischte Nahrung ersetzt, so erholt es sich rasch. Das ist von uns in einer Reihe von Versuchen beobachtet worden. Wir lassen einen Auszug aus dem Protokoll über den Versuch mit der Maus Nr. 3 folgen.

Maus Nr. 3. Gewicht 16,6 g.

4. Mai 1925. Die Maus beginnt ausschließlich autoklavisierten (3 Stunden bei 130°) Quark zu erhalten.

5. Mai 1925. Keine besonderen Veränderungen; war abends etwas träger.

6. Mai 1925. Verweigert die Nahrungsaufnahme. Schwach. Fell zu Knäueln zusammengeballt. Es wurden Gerste und Runkelrübe verabreicht.

7. Mai 1925. Vollkommenes Wohlbefinden.

8. Mai 1925. Dasselbe.

Bei ausschließlicher Eiweißernährung gesellten sich unzweifelhaft sehr oft auch *Erscheinungen des Hungers* hinzu, da die Kalorienmenge der in diesen Bedingungen genossenen Nahrung oft bedeutend niedriger war, als dem normalen Bedürfnis entspricht. Nichtsdestoweniger sind wir, ganz wie *Friedberger* (33), der Meinung, daß nicht das Hungern die Todesursache der Mäuse vorstellt. Bei ständigem Hungern trat der Tod der Mäuse am vierten Tage ein (Tabelle II); bei unvollständigem Hungern jedoch gingen die Mäuse, die gewöhnlich vor Beginn des Versuchs täglich 5 bis 6 g Gerste verzehrten und *bei Versuchen mit unvollständigem Hungern* 2 bis 3 g Gerste täglich erhielten, nach 3 bis 4 bis 6 Tagen zugrunde (Tabelle III).

Bei ausschließlicher Eiweißfütterung kamen Fälle vor, in denen der Tod sogar schon vor Ablauf von 24 Stunden eintrat.

Tabelle II.

Vollständiges Hungern (mit Wasser).

Tier Nr.	Zahl der *nach* Beginn des Versuchs verlebten Tage	Gewichtsverlust in Proz. des Ausgangsgewichts
46	3	26
93	3	33
94	3	30

Tabelle III.

Unvollständiges Hungern von Mäusen, die vor dem Versuch täglich 5 bis 6 g Gerste erhielten.

Tier Nr.	Tägliche Gersteration g	Zahl der *nach* Beginn des Verssuchs verlebten Tage	Gewichtsverlust in Proz. des Ausgangsgewichts
106	2	3	21
107	2	3	25
117	3	6	28
118	3	4	26

Außerdem nahm eine Anzahl von Mäusen bis zum Ende des Versuchs ziemlich gut Nahrung auf, und ein Hungertod ist somit in diesen Fällen vollkommen ausgeschlossen. Wir führen hier Protokollauszüge einiger dieser Versuche an.

Maus Nr. 7. Gewicht 20,0 g.

9. Mai 1925. Beginn der Fütterung mit *Casein* (nach *Hammarsten*). Das Casein wird vorher in Wasser aufgeweicht und in Form einer Pasta verabreicht. Die Maus frißt diese Pasta gerne.

10. Mai 1925. Gewicht 17,5 g. Hat während 24 Stunden 4 g Casein (trocken gewogen) verzehrt. Liegt auf der Seite. Zeitweise Krämpfe. Abends tot.



Maus Nr. 110. Gewicht 14,5 g.

23. September 1926. Beginn der Fütterung mit Markt*quark*. Frißt gut.
24. „ 1926. Gewicht 12,8 g. Hat 6,0 g verzehrt.
25. „ 1926. „ 12,5 g. „ 7,0 g „
26. „ 1926. „ 11,2 g. „ 9,0 g „ Keine sichtbare Veränderungen.
27. „ 1926. Gewicht 10,8 g. Hat 5,5 g verzehrt.
28. „ 1926. Sehr träge.
29. „ Gewicht 8,5 g. Hat während 48 Stunden 12 g verzehrt. Ist am Morgen tot vorgefunden.

Maus Nr. 102. Gewicht 14,0 g.

15. September 1926. Beginn der Fütterung mit koaguliertem *Pferdeserum.*
16. „ 1926. Gewicht 12,3 g. Hat in 24 Stunden 5 g verzehrt. Fell gesträubt. Krämpfe. Abends tot.

Maus Nr. 91. Gewicht 18,7 g.

4. September 1926. Beginn der Fütterung mit durch Kochen koaguliertem Hühnerei-Eiweiß.
5. „ 1926. Gewicht 16,5 g. Hat 10,5 g verzehrt.
6. „ 1926. „ 14,7 g. „ 8 g „
7. „ 1926. „ 14,3 g. „ 10 g „
8. „ 1926. „ 14,0 g. „ 6 g „ Ist am Morgen tot vorgefunden.

Schließlich spricht zugunsten der toxischen Ursache der beschriebenen Erscheinungen auch jener Umstand, daß *parallel der Verringerung des Eiweißteiles der Diät die Gültigkeit der Diät schwächer wird.* Von diesem Umstand ist noch weiter unten die Rede.

Auch die Annahme muß ausgeschaltet werden, daß es sich hier um einen Avitaminosezustand handle, denn die Lebensdauer der Mäuse, die eine avitaminöse Nahrung (autoklavisierte Gerste) erhielten, schwankte zwischen einer und zwei Wochen (Tabelle IV); andererseits hat die Zugabe von Vitaminen (Hefe, Zitronensaft, Lebertran) zur reinen Eiweißdiät der Mäuse (autoklavisierter Quark) die Resultate des Versuchs nicht verändert. Solche Beobachtungen sind von uns mit dem gleichen Ergebnis [das auch den Schlußfolgerungen von *Friedberger* (33) (34) entspricht] mehrmals wiederholt worden (siehe z. B. die Resultate der Versuche an den Mäusen Nr. 1 und 27).

Tabelle IV.

Diät: 3 Stunden bei 130° autoklavisierte Gerste.

Tier Nr.	Zahl der *nach* Beginn des Versuchs verlebten Tage	Gewichtsverlust in Proz. des Ausgangsgewichts
4	12	27
5	12	30
14	6	17
17	7	38

Durch Zugabe von Vitaminen zur autoklavisierten Gerste gelingt es, die Mäuse unbestimmt lange am Leben zu erhalten.

Die Intoxikationserscheinungen konnten ebenfalls nicht durch ein Fehlen von Salzen herbeigeführt werden, denn die Mäuse Nr. 101, 105, 32, 102, 108, 100, 27, 112, 111, 125, 113 und 114 erhielten ein nach *McCollum* und *Davis* (35) zusammengesetztes Salzgemisch.

Endlich sprechen zugunsten der Ansicht, daß es sich hier gerade um eine Eiweißintoxikation handelt, unsere Beobachtungen an Mäusen, die als Nahrung *ausschließlich Fett oder Kohlehydrate erhielten*: ihre Lebensdauer war bedeutend (zwei- bis dreimal) größer, als die Lebensdauer von Mäusen, welche ausschließlich mit Eiweiß ernährt wurden. Die Ergebnisse einiger dieser Versuche sind auf Tabelle V wiedergegeben.

Tabelle V.

Tier Nr.	Diät	Zahl der nach Beginn des Versuchs verlebten Tage	Vorhandensein d. Salzgemisches	Gewichtsverlust in Proz. des Ausgangsgewichts
6	Stärke	13	+	37
13	„	13	+	28
9	Rinderfett	8	+	22
33	„	7	+	26
34	„	8	+	32
104	„	5	+	32

Ob wir es in den eben erwähnten Versuchen mit Avitaminose zu tun haben, oder ob es sich um ein Eiweißhungern handelt, müssen weitere, gegenwärtig im Gange befindliche Versuche entscheiden. Um sich endgültig von der Gesetzmäßigkeit der beschriebenen Erscheinung zu überzeugen, haben wir für unsere Versuche Mäuse verschiedener Stämme benutzt. Die Ergebnisse der Versuche haben sich deswegen nicht verändert.

Als unsere Untersuchung sich schon ihrem Ende nahte, sind alle unsere Zweifel bezüglich der Möglichkeit so akuter Intoxikationen bei Einführung von Eiweißen per os durch die kürzlich veröffentlichten Studien *Friedbergers* (33) (34) beseitigt worden, da er ebenfalls eine akut verlaufende Intoxikation bei Ratten konstatiert hatte, die ausschließlich mit Hühnerei-Eiweiß ernährt wurden; dabei schwankte die Lebensdauer solcher Tiere zwischen 1 und 1,7 Tagen. In Fällen, in welchen die Nahrung der Ratten aus einem erwärmten Vollei bestand, entwickelten sich die Intoxikationserscheinungen chronisch; dabei hat der Verfasser den charakteristischen Haarausfall und den Wachstumsstillstand beobachtet, die auch von *Harris* (26) und *Boas* (27) beschrieben worden sind. Während aber *Boas* (28) glaubte, daß für Ratten nur das getrocknete käufliche Hühnerei-Eiweiß unvollwertig sei, hat *Friedberger* nachzuweisen vermocht, daß dieses Eiweiß in seinen verschiedenen Formen (sogar frisch) vielleicht nicht so unvollwertig, sondern direkt giftig ist. Unsere Versuche an Mäusen haben gezeigt, daß diese *Giftigkeit keine Besonderheit des Hühnerei-Eiweißes vorstellt*, sondern, daß sie auch anderen von uns geprüften Proteinen, sowie dem Pepton, eigen ist.

Unsere Versuche entsprechen daher vollkommen den Beobachtungen von *Hartwell* (36), die festgestellt haben, daß auch der Haarwuchs der Ratten durch verschiedene Eiweiße beeinflußt werden kann.



Unsere weiteren Versuche, über die eingehend an anderer Stelle berichtet werden soll, haben gezeigt, *daß ein Zusatz von Fett oder Stärke zum Eiweiß die Entwicklung der toxischen Erscheinungen offensichtlich schwächt*; dabei wird die Lebensdauer der Tiere um so länger, je größer prozentual in der Diät die beiden erstgenannten Nährstoffe enthalten sind, und dem Fett kommt, wie es scheint, in dieser Hinsicht eine höhere Bedeutung zu als den Kohlehydraten. Ob es bei diesen Zusätzen mehr auf die Verringerung der Eiweißrationen oder auf die eigene Bedeutung der Kohlehydrate und Fette für den normalen Verlauf des intermediären Eiweißumsatzes ankommt — diese Frage können nur weitere Versuche entscheiden.

Von Interesse ist jedoch der Umstand, daß, wenn es *dem Tiere selbst überlassen wird, sich seine Ration aus Eiweiß und Fett zusammenzustellen*, es das in den für sich vorteilhaftesten Verhältnissen verwirklicht.

Den Mäusen Nr. 99 und 109, die sich in Einzelkäfigen mit je drei Futtertrögen in jedem befanden, wurde die Nahrung folgendermaßen verabreicht: in einem Futtertrog befand sich Hühnerei-Eiweiß, im zweiten Rinderfett + Salzgemisch + alle Vitamine und im dritten Wasser. Diese Mäuse befinden sich, Fett und Eiweiß verzehrend, schon 52 und 38 Tage vollkommen wohl. Die Tiere werden weiter beobachtet [1]). Äußerst wertvoll erscheint für uns daher eine Bemerkung, die wir bei *Osborne* und *Mendel*, bei Autoren antreffen, die sogar für wachsende Ratten die Möglichkeit zulassen, daß ihnen eine Diät mit Überwiegen von Eiweiß zuträglicher ist. Diese Forscher, die auch in einer späteren Arbeit (23) die Möglichkeit eines Wachsens der Tiere bei einer Diät mit Vorwiegen von Eiweißen betonen, bemerken dabei aber: „good growth was secured in many trials, although, as a rule, the male rats *stopped gaining in weight at a maximum around 250 g. Further gains were often secured by change to a ‚mixed' diet, or by addition of some fat*" [2]) (S. 31; s. auch S. 16 und 17). Somit konnte auch von diesen Autoren festgestellt werden, daß mittels Überführung der Tiere auf eine gemischte Diät, oder durch Zugabe von Fett die bei eiweißreicher Ernährung auftretenden Insuffizienzerscheinungen beseitigt werden können.

Die Eigenschaft des Fettes — die Giftigkeit einer eiweißreichen Diät zu schwächen — ist auch von *Maignon* (20) (21) und *Visco* (38) bemerkt worden. Unsere Versuche haben aber gezeigt, daß dem Fett in dieser Hinsicht kein solcher Vorrang eingeräumt werden darf, wie das von *Visco* getan wird.

Es sind nämlich in unserem Laboratorium von Dr. *Kupermann* an zwei Rattenpaaren diesbezügliche Fütterungsversuche durchgeführt worden; das erste Rattenpaar erhielt ein Nährgemisch aus gleichen Mengen von Eiweiß (Casein) und Kohlehydrat (Stärke), das zweite Paar — ein Nährgemisch aus gleichen Mengen Eiweiß und Schweinefett. In beiden Fällen bekamen die Tiere außerdem das Salzgemisch (nach *McCollum* und *Davis*), doch entbehrte ihre Diät, wie auch bei *Visco,* der Vitamine. Es war dabei kein

[1]) *Bemerkung während der Korrektur.* Am 93. und 79. Tage des Versuchs befinden sich die Mäuse vollkommen gesund.

[2]) Von uns unterstrichen. *L. T.*



Unterschied im Allgemeinzustand und Gewicht der Tiere beider Gruppen zu konstatieren.

Die Gewichtskurven dieser Tiere sind in der Abb. 1 (Tabelle VI) angeführt.

Bei diesen vier Tieren war die Erscheinung des Haarausfalls, welche bei Fütterung mit Hühnerei-Eiweiß in den Versuchen von *Harris*, *Boas* und *Friedberger* statthatten, nicht zu konstatieren; unsere Ergebnisse stimmen in dieser Hinsicht mit den Befunden von *Boas* überein: *Boas* (27) ist es gelungen, durch Einführung von 20 Proz. Caseinogen in die Diät eine Restaurierung der Behaarung bei solchen Ratten zu erzielen, die ihre Behaarung infolge einer Fütterung mit Nährgemischen, deren einzige Proteinquelle das Hühnerei-Eiweiß war, verloren haben. In den Haar-

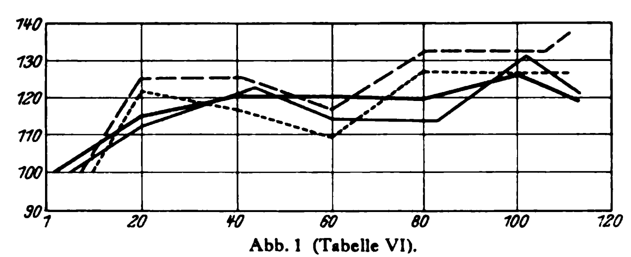


Abb. 1 (Tabelle VI).

Die *Ordinatenachse* zeigt das Körpergewicht in Prozenten des Anfangsgewichts.
Die *Abszissenachse* zeigt die Dauer der Beobachtung in Tagen.

———	Ratte 21; Anfangsgewicht	118 g	Casein, Schweinefett und Salzgemisch
———	„ 22; „	115 g	
– – – –	„ 41; „	126 g	Casein, Stärke und Salzgemisch.
....	„ 42; „	125 g	

wachstumsstörungen kommt daher, scheint es, dem Fehlen des zum Aufbau des Haarkeratins notwendigen Cystins keine unmittelbare Rolle zu (im Hühnerei-Eiweiß sind nach *Harris* 86 Proz. der ganzen Schwefelmenge nicht in Form von Cystin enthalten; im Casein ist ebenfalls wenig Cystin vorhanden). Von Bedeutung sind eben durch Intoxikation bewirkte trophische Störungen, wie das von *Friedberger* angenommen wird. Eine unmittelbare Rolle des Cystinmangels wird auch durch die Versuche von *Abderhalden* (39) ausgeschlossen.

Die Differenz zwischen den Ergebnissen unserer Versuche und derjenigen von *Visco* wird aller Wahrscheinlichkeit nach durch die kurze Zeitperiode, auf welche seine Beobachtungen sich erstrecken, bedingt; und wir glauben annehmen zu dürfen, daß sie nicht bestehen würde, wenn die Dauer seiner Experimente nicht auf 7 bis 8 bis 12 Tage beschränkt wäre.

Ohne jetzt schon ein entscheidendes Urteil über das tatsächliche Wesen jenes Zustandes fällen zu wollen, welcher nach Einführung per os großer Proteinmengen eintritt, möchten wir dennoch vorschlagen, ihn als **proteinogene Toxikose** zu bezeichnen. Diese Bezeichnung sollte, nach uns, auch die durch Fütterung mit eiweißreicher Nahrung herbeiführbare *alimentäre Amyloidose*, sowie vielleicht auch die Erscheinungen der hämoklastischen Krisen einbegreifen. Hierher könnte man vielleicht auch diejenigen Fälle von bronchialem Asthma hinzurechnen, die

Klewitz (39a) in seinem Vortrag zur Gruppe der Nahrungsmittelasthmafälle rechnet.

Gegenwärtig sind wir nicht imstande, uns mit Bestimmtheit über die Herkunft der beschriebenen Intoxikation auszusprechen. Mikroskopische und histochemische Untersuchungen, die gegenwärtig im Gange sind, werden wohl bestimmend auf die Richtung des Studiums des Mechanismus dieser Intoxikationen einwirken. Manche Forscher [*Osborne, Mendel* und *Park* (40) (41)] haben in Fällen einer an Eiweiß überreichen Diät Nierenhypertrophie bei Ratten festgestellt, andere [*Polvogt, McCollum* und *Simmonds* (24)] sogar degenerative Nierenveränderungen gefunden; und *Newburgh* (42) hat bei Kaninchen, die eine eiweißreiche Diät erhielten, Nephritiserscheinungen konstatiert.

Es unterliegt keinem Zweifel, daß bei Tieren verschiedener Arten verschiedenen Proteinen gegenüber eine verschiedene Sensibilität besteht. So konnten wir bei unseren früheren Untersuchungen bei *Tauben,* denen ausschließlich Casein verabreicht wurde, keine akuten Intoxikationserscheinungen beobachten (43) (44); auch haben wir eine solche Intoxikation bei Ratten nicht beobachten können, die in der Dauer von 40 bis 56 Tagen ausschließlich Casein erhielten (Versuche von Dr. *Kupermann,* die infolge zufälliger Umstände eingestellt werden mußten). Währenddessen gingen in den obenerwähnten Versuchen von *Maignon* und *Friedberger* ausschließlich mit Eiweiß gefütterte Ratten unter Erscheinungen akut eintretender Intoxikation ein, und unsere *Mäuse* starben von einer Diät, die aus verschiedenen Eiweißen (einschließlich des Caseins) bestand. Auch in unseren Versuchen gingen weiße Ratten, die Hühnerei-Eiweiß erhielten, ebenfalls unter Erscheinungen einer rasch zunehmenden Toxikose zugrunde; dabei näherte sich ihre mittlere Lebensdauer (6 Tage) mehr der von *Maignon* beobachteten (8 Tage) als der von *Friedberger* konstatierten (1 bis 1,7 Tage). Die Ursache dieser Erscheinungen ist wahrscheinlich im jugendlichen Alter der Tiere *Friedbergers* zu suchen. Es muß bemerkt werden, daß *Maignon* bei Tieren verschiedener Arten eine verschiedene Sensibilität verschiedenen Eiweißen gegenüber beobachtet hat. Wir lassen hier einen Protokollauszug eines unserer Versuche an Ratten folgen, denen ausschließlich *Hühnerei-Eiweiß* verabreicht wurde:

Ratte Nr. 47 erhält ausschließlich koaguliertes Hühnerei-Eiweiß. Zur Koagulation wurde das ganze Ei 15 Minuten lang gekocht.

1. Tag. Gewicht 150 g.
2. „ „ 138 g. Hat in 24 Stunden 25 g Eiweiß verzehrt.
3. „ „ 140 g. „ „ 24 „ 40 g „ „
Schläft die meiste Zeit. Stöhnt im Schlafe.
4. „ Gewicht 132 g. Stöhnt. Trägheit.
5. „ „ 132 g. „ „
6. „ „ 110 g. Hat in 48 Stunden 40 g Eiweiß verzehrt.
Gehbeschwerden. Frißt gerne an einer neuen Portion Eiweiß.
Am Abend tot vorgefunden.

Es liegen viele Gründe vor anzunehmen, daß es sich bei allen beschriebenen Tatsachen im bedeutenden Maße um eine verschiedene Permeabilität der Darmwand gegenüber verschiedenen Eiweißen bei Tieren verschiedener Arten handelt. Eine altbekannte Tatsache ist es, daß ver-

schiedene Eiweiße die Fähigkeit besitzen, unverändert oder sehr wenig verändert durch die Darmwand zu passieren und in dieser Form in den Blutstrom zu gelangen. Das sagen ja die alten Beobachtungen von *Brücke* (45) aus, der nach Aufnahme von Milch in den Chylusgefäßen durch Säure fällbares Casein vorfand; sich der Präzipitationsreaktion bedienend haben auch *Ascoli* und *Vigano* (46) die Möglichkeit eines Übertritts genuiner oder wenig veränderter Eiweiße in das Blut und in die Lymphe nachgewiesen.

Eieralbumin ist gerade jenes Eiweiß, das mit verhältnismäßig größter Leichtigkeit die Darmwand in unverändertem Zustande zu passieren vermag und, wird es in Übermaß in den Magen eingeführt, im Harn auftreten kann. In diesem Umstande kann man gewissermaßen die Ursache seiner größeren Giftigkeit erblicken, was auch einige Autoren (*Harris*, *Boas*) bewogen hat, die Frage von seiner Unvollwertigkeit, besonders in denaturierter Form (*Friedberger*), aufzuwerfen. Hierin ist wahrscheinlich auch eine der Ursachen zu suchen, weshalb *Boas* die Unvollwertigkeit des getrockneten Handelseiweißes bestimmen konnte (27) und gleich *Osborne* und *Mendel* (47) das bezüglich des frischen Eiweißes (28) nicht zu bestätigen vermocht hatte. Wenn in normalen Bedingungen ein solches Passieren des unveränderten Eiweißes auch statthat, so ist anzunehmen, daß das nur in ganz minimalem Maße geschieht. In gewissen Umständen kann aber die Permeabilität der Darmwand gegenüber Eiweiß eine Steigerung erfahren. *Hammarsten* (48) rechnet zu diesen Umständen die Überbürdung des Darms mit Eiweiß, die hohe Permeabilität der Darmwand bei jungen, noch gesäugten Tieren, sowie die ungenügende Denaturierung der Eiweiße durch den Magensaft. Studiert man die Bedingungen jener Versuche, bei welchen Erscheinungen der proteinogenen Toxikose aufgetreten waren, so stellt es sich heraus, daß sie in einer großen Anzahl von Fällen jenen Anforderungen entsprechen, von denen *Hammarsten* spricht. Gewöhnlich handelt es sich dabei gerade um junge, noch im Wachsen begriffene Tiere (Wachstumshemmungserscheinungen, *Drummond*, *Boas*, *Friedberger* u. a.), um gesäugte Tiere (*Hartwell*), sowie um Tiere, die eine ungewöhnlich eiweißreiche Diät erhalten (*Maignon*, *Friedberger*, unsere Experimente). Und wenn das Casein die Erscheinungen einer akuten Intoxikation bei Mäusen bewirkte und bei Ratten sie nicht zu bewirken vermochte, so ist die Ursache dafür *aller Wahrscheinlichkeit* nach in den verschiedenen Permeabilitätsbedingungen der Darmwand dieser Tiere zu suchen. Gegenwärtig versuchen wir es im Blute der Mäuse, mittels des Präzipitationsverfahrens die Anwesenheit jener Eiweiße aufzudecken, die bei der Einführung per os Intoxikationserscheinungen bedingen. Da in unseren Versuchen auch Pepton deutlich ausgeprägte toxische Eigenschaften gezeigt hat, so dürfen alle bisher angeführten Erwägungen *nicht nur auf die nativen Eiweiße* bezogen werden. Jene widersprechenden Ergebnisse, zu denen verschiedene Autoren bei Eiweißüberschuß in der Diät *B-avitaminöser Tiere* gelangt sind, hängt vielleicht im gewissen Maße von einer bei *verschiedenen Umständen differenten Resorptionsfähigkeit der Darmwand* gegenüber dem Eiweiß ab. Die Untersuchungen von *McCarrison* (49) haben gezeigt, welchen Veränderungen der Magen-Darmtrakt bei B-Avitaminose unterliegen kann, und *Gross* (50), *Winokuroff* (51) und *Tscherkes* (52) wiesen auf die bei dieser Avitaminose auftretenden motorischen Störungen des Verdauungstrakts hin. Der Charakter und der Grad der vom Verdauungsapparat erlittenen Veränderungen können in verschiedenen Fällen verschiedene Bedingungen für die

Permeabilität der Darmwand Eiweiß gegenüber zustandebringen; und hierin liegt, wenn auch zum Teil vielleicht, die Ursache der obenerwähnten Widersprüche. Es ist aber zweifelhaft, daß das Problem der proteinogenen Toxikosen *ausschließlich* auf dem Wege des Studiums der Resorptionsbedingungen, d. h. auf einem Gebiet seine Lösung finden wird, wo es mit dem *Problem der parenteralen Einführung des Eiweißes* so eng verflochten ist. Die Tatsache, daß eine Reihe von Forschern die Frage nach der Giftigkeit der Eiweiße auf verschiedene Weise beantwortet hat, daß nach *Maignon* jüngst wieder von *Friedberger* die Erscheinungen einer akuten Intoxikation bei Ratten beschrieben wird, die ausschließlich mit Hühnerei-Eiweiß gefüttert worden sind, und daß bis heute akute Intoxikationserscheinungen bei mit verschiedenen Eiweißen ernährten Mäusen nicht beschrieben worden sind — diese Tatsache ist von unserem Standpunkt aus beachtenswert. Es unterliegt keinem Zweifel, daß ähnliche Versuche wie die unseren auch in anderen Laboratorien (besonders im Zusammenhang mit dem Studium des Avitaminoseproblems) stattgefunden haben, und wenn die Forscher diese Erscheinungen nicht beobachtet haben oder zueinander widersprechenden Schlußfolgerungen gelangten, so sind, wie es scheint, in diesen Versuchen gewisse Bedingungen unbeachtet geblieben — Bedingungen, dank welchen die Eiweiße in gewissen Fällen giftiger sind als in anderen.

Es ist von Interesse, daß ebensolche Widersprüche auch bezüglich der alimentären Amyloidose bestehen: während in den Versuchen von *Kuczinsky* (29) eine an Eiweißen reiche Ernährung (Käse, Hühnerei-Eiweiß) bei Mäusen sehr oft zu einer Amyloidoseentwicklung führt, erhielt *Strasser* (53) bei ähnlicher Diät immer ein negatives Resultat. *Friedberger* weist auf einen Umstand — auf den Denaturationsgrad durch Wärme — als auf einen Faktor hin, der den Nährwert des Eiweißes herabsetzen und das Eiweiß toxisch machen kann. Doch waren in den Versuchen *Friedbergers* und den unserigen auch *nichtdenaturierte Eiweiße giftig* (frisches Hühnerei-Eiweiß in flüssigem Zustande). Es ist möglich, daß beim Prozeß der Denaturierung Bedingungen geschaffen werden, die das Eiweiß besonders giftig machen können. Diese Bedingungen sind uns noch unbekannt. Andere Tatsachen sprechen jedoch dafür, daß die unbedeutendsten, zuweilen fast unmerklichen Veränderungen in der Zusammensetzung der Diät letztere zur Ursache schwerer pathologischer Prozesse machen können. In dieser Hinsicht verdienen besondere Beachtung die Versuche von *Scherman* und *Pappenheimer* (54), sowie *McCollum* und seinen Mitarbeitern (55) (56), durch welche festgestellt worden ist, daß nichtige Schwankungen im Verhältnis von Ca und P in der Diät der Ratten fähig sind, auf ihre rachitisbewirkende Eigenschaft bestimmend einzuwirken; noch auffallender sind in dieser Hinsicht vielleicht jene unbedeutenden Schwankungen im Ca-Gehalt der Diät, deren es in den *Stepp*schen (57) Versuchen genügte, um einer vordem nur Xerophtalmie zu bewirkenden fähiger Diät noch gleichzeitig rachitogene Eigenschaften zu verleihen. Indem *Hartwell* Säfte verschiedener pflanzlicher Stoffe, Milch und Hefe zum eiweißreichen Futter eines säugenden Rattenweibchens zugab, gelang es ihr, jene schädlichen Einwirkungen zu beseitigen, die auf junge Ratten die Ernährung mit der Milch einer Mutter ausübt, welche eine eiweißreiche Diät erhält. *Hartwell* nimmt an, daß es sich hier um eine Zugabe von Vitamin B handle, doch hält sie selbst diese Annahme für nicht endgültig bewiesen.

Alle diese Tatsachen haben wir *nur der Analogie wegen angeführt*, und es liegen gar keine Gründe vor, unsere Beobachtungen durch

Erscheinungen der gleichen Kategorie zu erklären; sie betonen aber, wie delikat und schwer erkennbar jene Umstände sein können, die die Nahrung in einen pathogenen Faktor zu verwandeln vermögen. Vom Standpunkt dieser Betrachtungen aus verdient Beachtung eine von *C. Voit* und *Bauer* (58) noch im Jahre 1869 gemachte Beobachtung: in den Mastdarm eingeführtes reines Hühnerei-Eiweiß wird aus dem Mastdarm nicht resorbiert; führt man es aber in einer NaCl-Lösung ein, so geht die Resorption mit Leichtigkeit vor sich. Interessant ist in dieser Hinsicht auch der Hinweis von *Friedberger*, daß eine Erwärmung des Hühnerei-Eiweißes mit Eisenzucker seine Giftigkeit scharf herabsetzt.

Dem Problem der proteinogenen Toxikosen sollte deshalb eine größere Aufmerksamkeit zugewandt werden, weil in ihrer chronischen Form solche Toxikosen die Ursache jener sich allmählich und unauffällig entwickelnden pathologischen Prozesse sein können, deren Auftreten gegenwärtig noch unerklärlich ist.

1. Die Fütterung weißer Mäuse ausschließlich mit Proteinen (Casein, Hühnerei-Eiweiß, Gelatine, Blutserum, Edestin) bewirkt Erscheinungen einer akuten Intoxikation, die tödlich ist.

2. Eine Zugabe von Fetten oder Kohlehydraten zur Diät von Mäusen schwächt die Intoxikationserscheinungen; der Grad der Schwächung dieser Erscheinungen erhöht sich parallel der Steigerung der Mengen der zugegebenen Fette oder Kohlehydrate.

3. Die Intoxikationserscheinungen sind von der oft hinzutretenden Unterernährung unabhängig und gehören nicht in die Kategorie der Avitaminosezustände.

4. Solche akuten Intoxikationserscheinungen sind bei einer Ernährung ausschließlich mit Casein bei weißen Ratten und Tauben nicht beobachtet worden. Jedoch bei einer Ernährung mit Hühnerei-Eiweiß stellen sich bei Ratten Intoxikationserscheinungen ein.

5. Die bei Mäusen beschriebene Intoxikation stellt, wie es scheint, eine jener Schädigungsformen vor, welche von verschiedenen Forschern bei anderen Tieren durch eine Ernährung mit proteinreichem Futter bewirkt worden sind.

6. Für solche Zustände schlagen wir die Bezeichnung „*proteinogene Toxikosen*“ vor.

Literatur.

1) *L. Tscherkes*, diese Zeitschr. **133**, 75, 1922. — 2) *C. Funk* and *H. Dubin*, Science **52**, 447, 1920. — 3) *C. Funk* and *J. Paton*, Journ. Metab. Res. **1**, 739, 1922. — 4) *E. Abderhalden*, Pflügers Arch. **198**, 571, 1923. — 5) *H. Schaumann*, Arch. f. Schiffs- u. Tropenhyg. **14**, Beih. **8**, 53, 1910. — 6) *C. Eijkman* und *C. van Hoogenhuyse*, Virchows Arch. **222**, 301, 1916. — 7) *T. Osborne* and *L. Mendel*, Journ. of biol. Chem. **54**, 739, 1922. — 8) *K. Asada*, diese Zeitschr. **139**, 234, 1923. — 9) *S. Ederer*, ebendaselbst **158**, 197, 1925. — 10) *G. Hartwell*, Biochem. Journ. **15**, 140 und 563, 1921;

16, 78 und 825, 1922; 18, 785, 1924; 19, 1075, 1925. — 11) *M. Bond*, Biochem. Journ. 16, 479, 1922. — 12) *J. Drummond, G. Cowden* and *E. Hill.* Journ. of Physiol. 56, 413, 1922. — 13) *L. Tscherkes*, Wratschebnoje Djelo 1925, Nr. 4 (russisch). — 14) *Derselbe*, diese Zeitschr. 167, 203, 1926. — 15) *C. Funk* und *J. Collazo*, Chemie d. Zelle u. Gewebe 12, 195, 1925. — 16) *C. Funk, J. Collazo* et *J. Kaczmareck*, C. r. Soc. Biol. 92, 997, 1925. — 17) *P. Laviall*, Bull. des sc. pharmacol. 31, 376, 1924. — 18) *E. Pflüger*, Pflügers Arch. 50, 98, 1891. — 19) *Ch. Watson*, Append. to Food and Feeding., November 1910, zitiert nach *Drummond* u. a., Journ. of Physiol. 56, 413, 1922. — 20) *F. Maignon*, C. r. acad. 166, 919, 1918; 167, 94, 172, 281, 1919; 168, 474, 626, 1919. — 21) *Derselbe*, C. r. Soc. Biol. 82, 398, 400, 1358, 1919. — 22) *T. Osborne* and *L. Mendel*, Proc. of the Nat. Acad. Sc. 7, 157, 1921. — 23) *Dieselben*, Journ. of biol. Chem. 59, 13, 1924. — 24) *Polvogt, E. Mc Collum* and *N. Simmonds*, J. Hopkins Hosp. Bull. 34, 168, 1923. — 25) *V. Reader* and *J. Drummond*, Journ. of Physiol. 59, 472, 1925. — 26) *Harris*, Proc. Roy. Soc. London 94, 441, 1923. — 27) *M. Boas*, Biochem. Journ. 18, 422, 1924. — 28) *Derselbe*, ebendaselbst 18, 1322, 1924. — 29) *M. Kuczynski*, Virchows Arch. 239, 185, 1922; Klin. Wochenschr. 1923, Nr. 16 und 48. — 30) *J. Tanaka*, Münch. med. Wochenschr. 1910, Nr. 36, 1883. — 31) *Meyer* und *Wolf*, zitiert nach *Strasser*, Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. 36, 389, 1923. — 32) *A. Bickel*, diese Zeitschr. 146, 493, 1924. — 33) *E. Friedberger*, Deutsch. med. Wochenschr. 1926, Nr. 42, S. 1760. — 34) *Derselbe*, Klin. Wochenschr. 1926, Nr. 42, S. 1966. — 35) *E. McCollum* and *M. Davis*, Journ. biol. Chem. 20, 161, 1915. — 36) *G. Hartwell*, Biochem. Journ. 19, 75, 1925. — 37) *T. Osborne, L. Mendel* and *H. Cannon*, Journ. of biol. Chem. 59, 13, 1924. — 38) *S. Visco*, Rivista di Biologia 4, 1 und 3, 1922. — 39) *E. Abderhalden*, Pflügers Arch. 191, 278, 1921. — 39a) *Klewitz*, Verhandl. d. Deut. Ges. f. inn. Med. 38, 84, 1926. — 40) *T. Osborne* and *L. Mendel* Carnegie-Inst. of Washington, Years Book 22, 340, 1923; 23, 286, 1924; 24, 349, 1925. — 41) *T. Osborne, L. Mendel, E. Park* and *D. Darrow*, Proc. Soc. exper. biol. Med. 20, 452, 1923; zitiert nach *C. Funk*, Die Vitamine, 3. Aufl., S. 347. — 42) *L. Newburgh*, Medicine 2, 77, 1923; Arch. f. intern. Med. 24, 359, 1919. — 43) *L. Tscherkes*, diese Zeitschr. 149, 51, 1924. — 44) *Derselbe*, Verhandl. d. I. Allruss. Kongr. der Pathol. 1924 (russisch). — 45) *E. Brücke*, Sitz.-Ber. d. k. k. Acad. d. Wiss. 59, 1, 1869. — 46) *M. Ascoli* und *L. Vigano*, Zeitschr. f. phys. Chem. 39, 283, 1903. — 47) *T. Osborne* and *L. Mendel*, Journ. of biol. Chem. 15, 351, 1913; 16, 423, 1913; 20, 351, 1915. — 48) *O. Hammarsten*, Lehrb. d. physiol. Chem., 10. Aufl. S. 410. München 1923. — 49) *R. McCarrison*, Indian Journ. of Med. Res. 7, 283, 1919; Journ. Amer. Med. assoc. 78, Nr. 1, S. 1, 1922. — 50) *L. Gross*, Journ. of Pathol. and Bacter. 27, 27, 1924. — 51) *S. Winokuroff*, Wratschebnoje Djelo 1925, Nr. 15/17 (russisch). — 52) *L. Tscherkes*, ebendaselbst 1924, Nr. 8/9, S. 398 (russisch). — 53) *U. Strasser*, Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. 36, 389, 1923. — 54) *H. Sherman* and *A. Pappenheimer*, Proc. Soc. exper. Biol. and Med. 18, 193, 1920/21. — 55) *E. McCollum, N. Simmonds, P. Shipley* and *E. Park*, Journ. of biol. Chem. 47, 507, 1921. — 56) *E. McCollum*, The Newer knowledge of nutrition 2 edit., New York 1922. — 57) *W. Stepp*, Ergebn. d. Physiol. 24, 67, 1925. — 58) *C. Voit* und *J. Bauer*, Zeitschr. f. Biol. 5, 536, 1869.

Über die Wirkung physiologisch äquilibrierter Salzlösungen.

Von

D. L. Rubinstein (Odessa).

(Aus der Sewastopolschen Biologischen Station der Akademie der Wissenschaften und dem Biologischen Laboratorium des Medizinischen Instituts zu Odessa.)

(Eingegangen am 7. Januar 1927.)

Das Problem der äquilibrierten Salzlösungen.

Die Notwendigkeit bestimmter Salzkombinationen für das Überleben von isolierten Organen der Wirbeltiere wurde seit langem durch die Untersuchungen von *Merunovicz*, *Ringer*, *Locke* u. a. festgestellt. Die einzelnen Bestandteile solcher Salzgemische üben verschiedene, manchmal sogar entgegengesetzte (wie bereits *Ringer* sagte, „antagonistische") Einflüsse aus; durch ihr Zusammenwirken wird die normale Leistung aller Lebensfunktionen ermöglicht.

Die grundlegenden Untersuchungen von *Loeb* haben die Unentbehrlichkeit ähnlicher Salzkombinationen für verschiedene, auch niedere Wasser-, besonders Seewassertiere bewiesen. Es wurde dabei festgestellt, daß reine isotonische Lösungen der einzelnen Salze nicht wegen Mangel irgendwelcher unersetzlichen Stoffe schädigen, sondern daß ihre Kationen eine direkte Giftwirkung ausüben. In Gemischen läßt sich diese Giftwirkung einzelner Ionen durch andere, welche den ersten gegenüber als *Antagonisten* fungieren, völlig beseitigen. Durch eine passende Wahl der antagonistisch wirkenden Salze können vollkommen unschädliche Lösungen hergestellt werden. *Loeb* hat für sie die Benennung „*physiologisch-äquilibrierte Salzlösungen*" eingeführt. Mit diesem Namen bezeichnete er „Lösungen, deren Bestandteile so gewählt sind, daß die Giftwirkungen verschwinden, die jeder Bestandteil haben würde, wenn er allein in Lösung wäre"[1]. Die einfachste äquilibrierte Lösung, welche das Leben der meisten Organismen am besten erhält, enthält Salze der drei Kationen Natrium, Kalium und Calcium ungefähr in derselben Proportion, in welcher sie im Seewasser, sowie im Blutserum enthalten sind, also pro 100 NaCl etwa 2 KCl und 2 $CaCl_2$.

[1]) *Loeb*, Pflügers Arch. **107**, 252, 1905.

Ein solches Gemisch werden wir im folgenden abgekürzt als die *Na-K-Ca-Lösung*, bezeichnen.

Damit wurde die Grundlage der modernen Lehre von dem physiologischen Ionenantagonismus und der Ionenäquilibrierung gelegt. *Wo. Ostwald*, *Osterhout* und eine Reihe weiterer Forscher haben *Loebs* Ergebnisse an einer Anzahl verschiedener tierischer sowie pflanzlicher Organismen bestätigt. Die Erscheinungen des Ionenantagonismus wurden seitdem vielfach an Lebewesen, in letzter Zeit auch an kolloidalen Modellen untersucht; es ist ihnen eine reichliche, stets wachsende Literatur gewidmet. Es fehlt auch nicht an Versuchen — bis jetzt zwar erfolglos gebliebenen —, den Mechanismus der antagonistischen Ionenwirkungen aufzuklären.

Eine Frage, wir dürfen wohl sagen die Grundfrage der Lehre von den äquilibrierten Lösungen, hat aber bis jetzt wenig Beachtung gefunden. Es ist nämlich die Frage nach der Ursache der *dreifachen* Salzkombination in dem gewöhnlichen äquilibrierten Gemisch. Der einfache Antagonismus von zwei Salzen, um welche es sich bei den theoretischen Betrachtungen (sowie den meisten Versuchen an kolloidalen Modellen) handelt, ist in physiologischen Versuchen äußerst selten in reiner Form verwirklicht. Als Lebensmilieu ist stets eine ziemlich konstante Kombination von mindestens drei Kationen, nämlich die Na-K-Ca-Lösung erforderlich. Die Erklärung, welche dieser allgemeinen, universellen Erscheinung beiläufig gegeben wird, ist aber recht wenig begründet.

J. Loeb, der die direkte Giftigkeit der reinen Chlornatriumlösung und ihre Entgiftung durch Calcium- und Kaliumsalze zuerst festgestellt hat, äußerte zugleich die Vermutung, daß die Calciumionen allein ausreichend sind, um die Natriumlösung zu äquilibrieren. Das Calcium soll aber dabei wahrscheinlich eine eigene Giftwirkung ausüben, dergegenüber das Kalium als Antagonist auftritt. Es wären also „die Kaliumionen nur nötig, um gewissen Nebenwirkungen der Calciumionen entgegenzuwirken" [ohne direkt die Natriumionen zu äquilibrieren[1])]. Zu dieser Auffassung der äquilibrierten Salzlösung wurde *Loeb* wahrscheinlich durch die Experimente von *Ringer* u. a. am Herzmuskel geleitet, in welchen der Kalium-Calciumantagonismus deutlich zutage tritt. Auch die nach unserer Meinung — wir wollen es gleich hier bemerken — bei der Auffassung des Ionen-Antagonismus viel überschätzte Bedeutung der Valenz hat wohl dazu beigetragen. Man ist allzu leicht geneigt, allgemein in allen Fällen die zweiwertigen Kationen als Antagonisten den einwertigen gegenüberzustellen. Wie dem auch sei, kommt *Loeb* auf seine oben zitierte Deutung der Kaliumwirkung wiederholt zurück. In einer späteren Abhandlung über die Theorie der antagonistischen Salzwirkungen[2]) spricht er dieselbe Meinung nochmals aus, indem er den Mechanismus der Entgiftung der NaCl-Lösung analysiert: „Vielleicht reicht in Wirklichkeit für diese Zwecke das $CaCl_2$ aus, während das KCl nur nötig ist, um gewisse sekundäre schädliche Wirkungen des $CaCl_2$ zu beseitigen" (S. 258).

---

[1]) *Loeb*, Pflügers Arch. **80**, 229, 1900.
[2]) *Derselbe*, ebendaselbst **107**, 252, 1905.

Andere Forscher, welche sich mit dieser Frage befaßten, haben eine nur insofern abweichende Ansicht ausgesprochen, als sie das Hauptgewicht auf den Antagonismus zwischen den Kalium- und Calciumionen legten. Die Bedeutung der einzelnen Bestandteile eines ternären Salzgemisches (insbesondere für die Herztätigkeit) faßt *Höber*[1]) im folgenden Satze zusammen. „In der Hauptsache zeigt sich immer wieder ein Gegensatz zwischen Na und K einerseits und Ca andererseits. Dabei ist K der viel stärkere Antagonist des Ca als Na; dem Na-Ion dürfen wir wohl überhaupt zusammen mit dem Cl mehr die Funktion zuschreiben, bestimmte Grundbedingungen für den Lösungszustand der organischen Kolloide und zugleich einen bestimmten osmotischen Druck der Säfte zu gewährleisten" (S. 688). Viele Autoren sind auf eine nähere Analyse der zwischen den Ionen bestehenden Wechselbeziehungen überhaupt nicht eingegangen und haben sich mit dem allgemeinen Hinweis darauf beschränkt, daß in der äquilibrierten Salzlösung die einzelnen Ionenantagonisten ihre respektiven Giftwirkungen gegenseitig aufheben.

Die bisher über die Natur des einfachen äquilibrierten Dreisalzgemisches ausgesprochenen Ansichten können wir also in folgender Weise kurz zusammenfassen. Das in reiner Lösung giftige Chlornatrium wird durch Calciumionen entgiftet; letztere müssen ihrerseits durch Kaliumionen äquilibriert werden, wobei dem Kalium-Calcium-Antagonismus nach einigen Autoren eine untergeordnete, nach anderen aber die Hauptrolle zukommt.

In einer früheren Untersuchung, die sonst andere Ziele verfolgte, sind wir unter anderem zu folgendem Ergebnis gelangt, das wir hier wörtlich anführen wollen. „Auf den untersuchten Organismus (*Fabricia sabella Ehr.*) übt das Natriumion zwei verschiedene toxische Wirkungen aus, von denen die eine antagonistisch durch das Kalium, die andere ganz unabhängig davon durch das Calcium unterdrückt wird. Zwischen dem Kalium und den zweiwertigen Kationen eines gewöhnlichen äquilibrierten Gemisches braucht — der herrschenden Meinung zuwider — überhaupt kein Antagonismus zu bestehen"[2]). In diesem Falle müssen wir also nicht dem Calcium, sondern dem Natrium eine zweiartige Giftigkeit, eine „sekundäre schädliche Wirkung" zuschreiben, welche die Kaliumionen beseitigen sollen. Dieses Resultat steht offenbar in schroffem Widerspruch zu der weitgehend verbreiteten Auffassung der physiologischen Wechselwirkungen von Ionen in Gemischen. Haben wir es hier mit einer sonderbaren Ausnahme zu tun, oder muß eben diese Auffassung einer tiefgreifenden Revision unterliegen? Darüber können nur planmäßig angestellte Versuche entscheiden. Es soll die Frage entschieden werden: Besitzt das Natrium- oder das Calciumsalz eine sekundäre Giftigkeit, welche die Beteiligung eines

[1]) *Höber*, Physikalische Chemie der Zelle und der Gewebe II, 1924.
[2]) *Rubinstein*, Pflügers Arch. **214**. 1, 1926.



dritten Kations, des Kaliums notwendig macht? Mit anderen Worten: Worin besteht die physiologische Rolle des Kaliums in den äquilibrierten Salzlösungen?

Methode.

Es ist von uns am anderen Orte[1]) gezeigt worden, daß in komplizierten äquilibrierten Gemischen (von drei oder mehr Salzen) die antagonistischen Abhängigkeiten zwischen je zwei Salzen ebenso genau festgestellt werden können, als wenn die betreffenden Salze allein in der Lösung vorhanden wären. Die dort geschilderte Methode wurde auch in der vorliegenden Untersuchung zu einer genauen Analyse der physiologischen Ionenwechselwirkungen angewendet. Sie soll hier nur kurz angedeutet werden.

Diese Methode besteht eigentlich darin, daß bei möglichst verschiedenen Konzentrationen des einen Salzes die Konzentrationsschwelle eines anderen festgestellt wird, welche — unter Konstanterhaltung aller übrigen Komponenten — zur Äquilibrierung der Lösung eben ausreicht. Dieses Verfahren wird nacheinander für jedes Salzpaar wiederholt. Als *Antagonismus* wird eine symbathe Abhängigkeit zwischen den beiden Salzen bezeichnet; die entgegengesetzte (antibathe) Abhängigkeit zeugt von einem *Synergismus* ihrer Wirkungen. Bleibt endlich die Konzentrationsschwelle des einen Salzes von Veränderungen des anderen unbeeinflußt, so fehlt zwischen ihnen die eine wie die andere Beziehungsart. Von besonderem Interesse ist nun der Fall, wo solche in ihrer physiologischen Wirkung voneinander vollkommen unabhängige Salze ein drittes äquilibrieren. Es ist dies nur unter der für die Theorie der ternären physiologischen Salzlösungen überaus wichtigen Bedingung möglich, daß das letzte Salz eine zweiartige Giftigkeit besitzt, welche von den beiden Antagonisten zusammen unterdrückt wird.

Auf diese Weise lassen sich die physiologischen Wechselwirkungen der Ionen in Salzlösungen verfolgen und analysieren. Jede beliebige Lebenserscheinung kann dabei als biologischer Indikator und Zeiger einer Äquilibrierung der auf dieselbe einwirkenden Ionen dienen. Hier interessieren uns allerdings nicht die Ionenwirkungen auf irgend eine besondere Spezialfunktion, sondern jene fundamentalen Ionenbeziehungen, welche in dem gewöhnlichen äquilibrierten Gemisch die Erhaltung der Lebensfähigkeit selbst ermöglichen. Als Kriterium einer vollständigen Äquilibrierung wurde daher das Überleben der Tiere gewählt. Ebenso wie in unseren früheren Untersuchungen wurden diejenigen Lösungen als unschädlich anerkannt, in welchen die Versuchstiere wenigstens 16 bis 20 Stunden überlebten.

Um aus den in Betracht kommenden Tieren die am meisten geeigneten Versuchsobjekte auszuwählen, haben wir sie einer vorherigen Prüfung unterworfen. Die erste Bedingung, der sie genügen sollten, war ein schnelles (höchstens nach wenigen Stunden eintretendes) Absterben in der isotonischen Chlornatriumlösung, sowie in beliebigen binären Gemischen ($NaCl + KCl$ bzw. $NaCl + CaCl_2$). Tiere, bei welchen der Absterbevorgang in reinen Salzlösungen oder selbst in einem der binären Gemische zu langsam vor sich geht, sind zum Studium der dritten Salzkomponente wenig geeignet. In der ternären Na-K-Ca-Lösung, welche die Chloride von Natrium, Kalium und Calcium in der gewöhnlichen Proportion enthält, sollen sie dagegen

[1]) l. c.



dauernd am Leben bleiben. Im Falle ihnen noch ein viertes Kation, das Magnesium, oder eine bestimmte, ins Alkalische verschobene Reaktion erforderlich wäre, so würde dadurch eine unerwünschte Komplikation in die Veranstaltung und Deutung der Versuche eingeführt. Es entsteht sodann eine weitere Aufgabe: die Konzentrationsgrenzen festzustellen, innerhalb deren jede einzelne Komponente der Salzlösung ohne die Tiere zu schädigen variiert werden kann. Diese Grenzen bestimmen zugleich das Gebiet, auf dem die eigentliche Untersuchung vorzunehmen ist.

Nach diesem Plane wurden unsere Versuche im Sommer 1926 in Sewastopol an der Biologischen Station der Akademie der Wissenschaften ausgeführt. Dem Vorstand und dem Personal der Station möchte ich auch an dieser Stelle für ihr freundliches Entgegenkommen herzlich danken. Als Versuchsobjekte wurden nach mehreren Vorversuchen zwei Krebstiere — *Diogenes varians* und *Porcellanides longimana* — sowie eine Triclade — *Procerodes lobata* — gewählt. Sämtliche zu einer Serie gehörigen Versuche wurden zu gleicher Zeit angestellt, wodurch die Möglichkeit von Temperaturunterschieden oder sonst irgendwie ungleichartiger Versuchsbedingungen vollkommen ausgeschaltet wurde. Zur Herstellung der Salzlösungen wurden reinste Präparate der Firmen Kahlbaum und Merck verwendet.

Versuche an Diogenes.

Als erstes Versuchsobjekt diente uns der Einsiedlerkrebs *Diogenes varians Hell.*, welcher in der Schale der Gastropode *Nassa reticulata L.* lebt. Die Tiere wurden vorsichtig aus der Schale herausgeholt, was nach einiger Übung ziemlich leicht gelang, und zu je zwei in kleine Kristallisierschalen mit der zu prüfenden Lösung gesetzt; mit derselben Lösung wurden sie vorher sorgfältig abgespült. Aus ihrer Schale entnommene Krebse sind sehr kriegerisch. In einem Gefäß sich zusammen befindende Tiere reißen einander mit der Schere die Beine aus; bald sieht man sie alle stark verstümmelt. Um solchen Schädigungen vorzubeugen, wurde sämtlichen Versuchstieren die bewegliche Klaue der großen Scheere vorsichtig abgeschnitten. Die Weibchen scheinen etwas weniger resistent als die Männchen zu sein; nachdem dies bemerkt wurde, haben wir ausschließlich die Männchen für unsere Versuche verwendet. Wir haben es ebenfalls meistens vermieden, vom *Peltogaster paguri* angegriffene Tiere zu benutzen, obwohl keine Verschiedenheiten den Salzwirkungen gegenüber zwischen solchen und normalen Tieren konstatiert wurden.

In einer reinen halbmolaren NaCl-Lösung sowie in binären Lösungen von 100 ccm m/2 NaCl + 2 ccm m/2 KCl bzw. 100 ccm m/2 NaCl + 2 ccm m/2 $CaCl_2$ sterben die Krebse im Laufe von wenigen Stunden ab; kein einziger ist am nächsten Tage lebendig. In dem ternären Gemisch von 100 ccm m/2 NaCl + 2 ccm m/2 KCl + 2 ccm m/2 $CaCl_2$, welches wir abgekürzt als m/2 Na-K-Ca-Lösung bezeichnen wollen, bleiben dagegen die Tiere dauernd am Leben. In einem Versuch lebten sie z. B. in einer solchen Lösung über 8 Tage (vom 3. bis 11. Juli). Wie Tabelle I zeigt, können die Einsiedlerkrebse bedeutende Schwankungen des Calciumgehalts der ternären Salzlösung gut aushalten. Der Zustand der Tiere ist in dieser und in den folgenden Tabellen — falls nicht andere Zeitintervalle angegeben werden — am nächsten Tage (16 bis 20 Stunden nach Beginn des Versuchs) protokolliert. Die Zeichenerklärung ist überall die gleiche: + = abgestorben, ○ = lebendig.

Tabelle I (Versuch vom 6. Juli).

Ausgangslösung	Calciumgehalt (ccm m/2 $CaCl_2$)					
	0,2	0,5	2,0	10,0	15,0	20,0
100 ccm m/2 NaCl + 2 ccm m/2 KCl	+	O	O	O	+	+

Der Calciumgehalt konnte also in sehr weiten Grenzen variiert werden: von 0,5 bis 10,0 Ca pro 100 Na. Bei der geringsten Calciumkonzentration (0,5 Ca) befanden sich jedoch die Tiere in einem schlechten Zustande und kamen bei anderen schädlichen Einwirkungen leicht um. In den folgenden Versuchen haben wir uns daher auf eine zehnfache Veränderung des relativen Calciumgehalts (also von 1,0 bis 10,0 Ca pro 100 Na) beschränkt.

Die zur Erhaltung des Lebens notwendigen Kaliumkonzentrationen liegen in einem viel engeren Intervall. Die Kaliumwirkung ist aus Tabelle II ersichtlich. Der in dieser Tabelle vorgelegte Versuch wurde am nächsten Tage (bis zum 8. Juli) mit demselben Resultate fortgesetzt; sämtliche Tiere blieben in den Lösungen, welche 1,0 bis 4,0 ccm KCl enthielten, auch nach 48 Stunden am Leben.

Tabelle II (Versuch vom 6. Juli).

Ausgangslösung	Kaliumgehalt (ccm m/2 KCl)				
	0,5	1,0	2,0	4,0	5,0
100 ccm m/2 NaCl + 2 ccm m/2 $CaCl_2$ . . .	+	O	O	O	+

Vielfach wiederholte Versuche haben für die *untere Kaliumschwelle* außerordentlich konstante Ergebnisse geliefert. Eine Lösung, welche das Chlornatrium in der oben angegebenen Konzentration (m/2) enthält, zeigte sich bei einem relativen Kaliumgehalt von 1,0 K (pro 100 Na) vollkommen unschädlich, während schon ein zweimal kleinerer Kaliumgehalt (0,5 K pro 100 Na) das Absterben sämtlicher Tiere verursachte. In der letzten Lösung wurden im ganzen 14 Versuche angestellt; ausnahmslos gingen alle Versuchstiere im Laufe von höchstens 16 bis 20 Stunden zugrunde. Eine so scharfe Einstellung der Kaliumschwelle stellt äußerst günstige Bedingungen vor, um seine Abhängigkeit vom Calcium zu untersuchen. Das geschah in der Weise, daß man zu gleicher Zeit und unter sonst konstanten Bedingungen die Kaliumgrenze bei verschiedenen Konzentrationen des Calciums ermittelte. Es wurden zu diesem Zwecke sechs Versuchsserien ausgeführt (am 8., 9., 10., 13., 15. und 16. Juli). Da sie absolut identische Resultate geliefert haben, mögen die hier in abgekürzter Form angeführten zwei Beispiele (Tabelle III und IV) genügen. Sie haben einen strengen Beweis dafür erbracht, daß die minimale, zur Äquilibrierung der Lösung eben ausreichende Kaliummenge vom Calciumgehalt völlig unabhängig ist, möge der letzte selbst eine zehnfache Verstärkung erfahren.

Tabelle III (Versuch vom 9. Juli).

Ausgangslösung	Kaliumgehalt (ccm m/2 KCl)		
	0,5	1,0	2,0
100 ccm m/2 NaCl + 1 ccm m/2 $CaCl_2$	+	O	—
100 ccm m/2 NaCl + 10 ccm m/2 $CaCl_2$	+	O	O

Tabelle IV (Versuch vom 16. Juli).

Ausgangslösung	Kaliumgehalt (ccm m/2 KCl)	
	0,6	1,2
100 ccm m/2 NaCl + 1 ccm m/2 $CaCl_2$	+	O
100 ccm m/2 NaCl + 10 ccm m/2 $CaCl_2$	+	O

Somit kann das Kalium nicht als Antagonist des Calciums fungieren, sonst würde seine zur Äquilibrierung erforderliche Konzentration mit derjenigen des Calciums symbath anwachsen. Es bleibt also nur die Möglichkeit einer unmittelbaren antagonistischen Wirkung des Kaliums auf das Natrium übrig. Sie läßt sich auch direkt nachweisen. Die Diogeneskrebse sind relativ wenig euryhalin, doch können sie eine Verminderung der NaCl-Konzentration um die Hälfte (von m/2 bis m/4) gut aushalten. Eine solche ist für unsere Zwecke vollkommen hinreichend. Sie bedingt schon eine bedeutende Herabsetzung der Kaliumschwelle, während dieselbe durch eine sogar zehnfache Erniedrigung der Calciumkonzentration nicht verschoben werden konnte. Aus einer Reihe ganz gleichartig ausfallender Versuche (vom 9., 10., 13., 15. und 16. Juli) sei hier nur ein Beispiel ausgewählt (s. Tabelle V).

Tabelle V (Versuch vom 13. Juli).

Ausgangslösung	Kaliumgehalt (ccm m/2 KCl)		
	0,25	0,5	1,0
100 ccm m/2 NaCl + 10 ccm m/2 $CaCl_2$	—	+	O
100 ccm m/2 NaCl + 1 ccm m/2 $CaCl_2$	—	+	O
100 ccm m/4 NaCl + 1 ccm m/2 $CaCl_2$	+	O	—

Kalium und Calciumionen sind also keine Antagonisten. Sie können aber auch nicht als Synergisten wirken und ihre natriumentgiftenden Wirkungen summieren, denn in diesem Falle wäre bei einem größeren Calciumgehalt entsprechend weniger Kalium zur Äquilibrierung des Natriums und Ausgleichung seiner Giftigkeit erforderlich; der Mangel an einem Ion würde durch den Überschuß des anderen kompensiert. Somit wirken Kalium und Calcium als Antagonisten des Natriums vollkommen unabhängig voneinander, indem sie zwei verschiedene Komponenten der Natriumgiftigkeit unterdrücken.

In diesen Versuchen tritt die physiologische Bedeutung des Kaliums, als eines Antagonisten der „sekundären schädlichen Wirkung" des Natriums, deutlich zutage. Wir wollen aber die Ionenbeziehungen weiter verfolgen, um auch die andere Seite der Abhängigkeit aufzuklären. Welche Ionen sind nämlich Antagonisten des Kaliums selbst? Diese Frage läßt sich durch die Untersuchung der *oberen Kaliumgrenze* entscheiden, also derjenigen maximalen Konzentration der Kaliumionen, nach deren Überschreitung schon ihre eigene Giftigkeit hervortritt. Es wurde schon darauf hingewiesen, daß die Kaliumkonzentrationen, welche das Leben unseres Einsiedlerkrebses nicht vernichten, in einem ziemlich engen Intervall liegen, nämlich zwischen 1 und 4 KCl pro 100 NaCl + 2 $CaCl_2$ (s. Tabelle II). Die obere Kaliumgrenze ist dabei nicht weniger scharf als die untere

definiert. Schon bei 5 K (pro 100 Na) sterben sämtliche Tiere ab; kein einziges lebte in einer solchen Lösung bis zum nächsten Tage, obwohl der Versuch zehnmal wiederholt wurde. In den folgenden Versuchen haben wir jedoch die Konzentrationen etwas weniger fein abgestuft, und zwar als höchste subletale Kaliumkonzentration 3,0 bzw. 3,5 K (pro 100 Na) verwendet, da bei 4,0 K die Lösung gelegentlich schon schädlich wirkte und das Absterben eines Teiles der Versuchstiere verursachen konnte.

Wiederholte Versuche haben gezeigt, daß auch die obere Kaliumgrenze in keiner Abhängigkeit vom Calciumgehalt steht. Die Kaliumionen können ebensowenig durch Calciumionen entgiftet werden, wie sie auch selbst unfähig sind, den letzteren entgegenzuwirken. Die Natriumkonzentration übt dagegen auf die obere Kaliumgrenze einen starken Einfluß aus, indem ihre Veränderungen eine symbathe Verschiebung derselben hervorrufen; der Antagonismus von Natrium und Kalium ist also ein gegenseitiger. Unsere Versuche, von denen hier zwei Beispiele angeführt werden (s. Tabelle VI und VII), zeigen diese Verhältnisse mit derselben geradezu schematischen Klarheit.

Tabelle VI (Versuch vom 13. Juli).

Ausgangslösung	Kaliumgehalt (ccm m/2 KCl)	
	3,5	5,0
100 ccm m/2 NaCl + 10 ccm m/2 $CaCl_2$	○	+
100 ccm m/2 NaCl + 1 ccm m/2 $CaCl_2$	○	+

Tabelle VII (Versuch vom 15. Juli).

Ausgangslösung	Kaliumgehalt (ccm m/2 KCl)		
	2,0	3,0	5,0
100 ccm m/2 NaCl + 10 ccm m/2 $CaCl_2$	—	○	+
100 ccm m/2 NaCl + 1 ccm m/2 $CaCl_2$	—	○	+
100 ccm m/4 NaCl + 1 ccm m/2 $CaCl_2$	○	+	—

Zwecks einer definitiven Prüfung aller festgestellten Beziehungen wurden zwei Kontrollserien ausgeführt. Sie geben ein vollständiges Bild der Kaliumgrenzen einer für *Diogenes* äquilibrierten Salzlösung in ihrer Abhängigkeit von der Natrium- und Calciumkonzentration (s. Tabelle VIII).

Tabelle VIII (Versuch vom 16. Juli).

Ausgangslösung	Kaliumgehalt (ccm m/2 KCl)						
	0,25	0,5	0,6	1,2	2,0	3,0	5,0
100 ccm m/2 NaCl + 10 ccm m/2 $CaCl_2$	—	—	+	○	—	○	+
100 ccm m/2 NaCl + 1 ccm m/2 $CaCl_2$	—	—	+	○	—	○	+
100 ccm m/4 NaCl + 1 ccm m/2 $CaCl_2$	+	○	—	—	○	+	—

Versuche an Porcellanides.

Nach einem ähnlichen Plane wie an *Diogenes* haben wir auch die experimentelle Untersuchung eines anderen dekapoden Krebses — des *Porcellanides longimana Czern.* — durchgeführt. In unseren Versuchen an *Diogenes* wurde die Konzentration der Lösungen zwischen m/4 und m/2 variiert; die Porcellaniden halten aber schon eine m/2 Lösung nicht aus. Für diese sehr stenohalinen Tiere wurden ausschließlich m/4 Lösungen verwendet, deren Salzgehalt demjenigen ihres gewöhnlichen Milieus annähernd gleich ist. Im Schwarzen Meere, in der Nähe von Sewastopol, beträgt ja die Salinität in der oberflächlichen Wasserschicht etwa 18 g pro Liter, was ungefähr einer 0,3 mol. NaCl-Lösung entspricht; doch wurde eine ganz genaue Isotonie nicht angestrebt.

In der äquilibrierten 0,25 mol. Na-K-Ca-Lösung bleiben die Porcellaniden dauernd am Leben, gehen aber in allen binären Gemischen (NaCl + KCl sowie NaCl + $CaCl_2$) äußerst schnell (in wenigen Stunden oder selbst Minuten) zugrunde. Nicht nur die Konzentration des Natriumchlorids, von welchem die Gesamtkonzentration der Lösung abhängt, sondern auch der Kalium- und Calciumgehalt können nur ziemlich wenig verändert werden. Die Lebensgrenzen der Porcellaniden wurden für jede Komponente der ternären Salzlösung in derselben Weise festgestellt, wie dies bei *Diogenes* geschah. Wir werden daher auf diese Vorversuche nicht näher eingehen; nur die Resultate sollen hier kurz mitgeteilt werden.

Die Calciumschwelle war merkbar höher als bei *Diogenes*; bei einem relativen Gehalt von 1 Ca pro 100 NaCl + 2 KCl blieb die Äquilibrierung aus und die Lösung erwies sich als stark giftig. Nur mit 1,5 Ca ließ sich in den meisten Fällen und mit 2 Ca ausnahmslos eine vollständige Äquilibrierung erzielen. Zugleich war die obere Calciumgrenze stark herabgesetzt; bei 5 oder 6 Ca blieb die Lösung noch vollkommen normal, aber schon bei 8 bis 10 Ca (pro 100 Na + 2 K) zeigte sich die schädliche Wirkung des Calciumüberschusses. Die Tiere lebten allerdings in einer solchen Lösung meistens während 24 Stunden oder etwas darüber, wurden aber deutlich gelähmt und kamen zuletzt um. Der relative Calciumgehalt konnte also bei unseren Versuchen nur von 1,5 bzw. 2,0 bis 6 Ca, also höchstens um das Vierfache vergrößert werden. Da aber die untere Kaliumschwelle sich mit großer Genauigkeit feststellen ließ, konnten wir uns bei ihrer Untersuchung mit dieser eingeschränkten Amplitude der Konzentrationsänderung des Calciums begnügen. Es wurde auch in diesem Falle der Beweis erbracht, daß die zur Äquilibrierung der Salzlösung notwendige Kaliumkonzentration vom jeweiligen Calciumgehalt völlig unbeeinflußt bleibt. Die Ergebnisse von drei Versuchen, welche in Tabelle IX zusammengestellt sind, lassen

Tabelle IX.

Lösung	Versuch vom		
	27. VII.	28. VII.	31. VII.
100 ccm NaCl + 2 ccm $CaCl_2$ + 0,5 ccm KCl . .	+	+	+
100 ccm NaCl + 2 ccm $CaCl_2$ + 1,0 ccm KCl . .	○	○	○
100 ccm NaCl + 6 ccm $CaCl_2$ + 0,5 ccm KCl . .	+	+	+
100 ccm NaCl + 6 ccm $CaCl_2$ + 1,0 ccm KCl . .	○	○	○

diese Unabhängigkeit der Kaliumschwelle deutlich hervortreten. Die abgekürzten schematischen Bezeichnungen (+ und ○) behalten in dieser und den folgenden Tabellen ihre frühere Bedeutung. Da sämtliche Salze hier ausschließlich in einer m/4 Lösung verwendet wurden, sind die Angaben der Konzentration weggelassen und nur die Mischungsverhältnisse angegeben.

Eine so gute Reproduzierbarkeit der Resultate, wie sie aus dieser Tabelle ersichtlich ist, hat uns dazu veranlaßt, eine noch genauere Bestimmung der Kaliumgrenze zu versuchen. Das ist uns tatsächlich in zwei Versuchen (einer von ihnen ist in Tabelle X angeführt) gelungen. Sie zeigen, daß eine dreifache Erhöhung der Calciumkonzentration nicht imstande ist, die Kaliumschwelle in der äquilibrierten Lösung sogar um 50 Proz. zu verschieben.

Tabelle X (Versuch vom 1. August).

Ausgangslösung	Kaliumgehalt (ccm m/4 KCl)	
	0,5	0,75
100 ccm NaCl + 2 ccm $CaCl_2$	+	○
100 ccm NaCl + 6 ccm $CaCl_2$	+	○

Das Gegenstück zu diesen Versuchen bildet der — allerdings nicht mit derselben Präzision — erbrachte experimentelle Beweis dafür, daß auch die Calciumschwelle ihrerseits in keiner Abhängigkeit von der Kaliumkonzentration steht. Von den dreimal mit demselben Ergebnis wiederholten Versuchen (vom 26., 27. und 28. Juli) ist der eine in Tabelle XI angeführt. Somit sind die zur Herstellung einer physiologisch äquilibrierten Lösung erforderlichen Kalium- und Calciummengen völlig unabhängig voneinander. Die Kaliumionen sind ebensowenig dazu bestimmt, eine toxische Wirkung der Calciumionen zu beseitigen, wie auch die letzten ihrerseits nicht zur Ausgleichung der Kaliumwirkung dienen. Es besteht zwischen den beiden Ionenarten weder Antagonismus noch Synergismus. Ihre Bedeutung in der äquilibrierten Salzlösung soll in der Wechselwirkung eines jeden von ihnen mit den Natriumionen seine Erklärung finden.

Tabelle XI (Versuch vom 28. Juli).

Ausgangslösung	Calciumgehalt (ccm m/4 $CaCl_2$)	
	1,0	2,0
100 ccm NaCl + 1 ccm KCl	+	○
100 ccm NaCl + 3 ccm KCl	+	○

Zum Schluß wurde noch die *obere* Kaliumgrenze untersucht. Tabelle XII gibt einen Versuch wieder, ein anderer (vom 30. Juli) hat ähnliche Resultate ergeben. Sie scheinen auf eine symbathe Beziehung zwischen der oberen Kaliumgrenze und dem Calciumgehalt hinzuweisen. Im Gegensatz zu dem, was für *Diogenes* festgestellt wurde, wäre es also hier möglich, wenigstens den Kalium*überschuß* durch Calciumionen teilweise zu entgiften. Die Versuche waren jedoch nicht zahlreich und eindeutig genug, um diese Ergebnisse als endgültig betrachten zu können.

Tabelle XII (Versuch vom 29. Juli).

Ausgangslösung	Kaliumgehalt (ccm m/4 K Cl)		
	3,0	4,0	5,0
100 ccm Na Cl + 2 ccm $CaCl_2$	O	+	—
100 ccm Na Cl + 6 ccm $CaCl_2$	—	O	O

Versuche an Procerodes.

Bei unserem dritten Versuchsobjekt — der Turbellarie *Procerodes* (*Gunda*) *lobata D. Schm.* (Triclade) — tritt die Entgiftungsschwelle nicht so scharf, wie bei den untersuchten Krebstieren, hervor. Dementsprechend können die Versuchsdaten nicht immer durch einfache schematische Zeichen (lebendig, tot) ausgedrückt werden, wie das bisher geschah. Es kommt nämlich oft vor, daß nur ein gewisser Prozentsatz der Tiere überlebt, oder daß zugleich ihre Beweglichkeit mehr oder minder stark beeinträchtigt wird. Die sehr breite Amplitude der Konzentrationsänderungen, die von den Tieren ertragen werden kann, verleiht jedoch den Versuchsergebnissen eine genügende Zuverlässigkeit.

Procerodes ist sehr euryhalin und hält bedeutende Schwankungen des gesamten Salzgehalts aus. Hat die ursprüngliche äquilibrierte Lösung eine m/4 Konzentration, so wird noch eine acht- bis zehnmal schwächere Lösung ($^1/_{32}$ mol. bis $^1/_{40}$ mol.) von den Tieren gut vertragen. Es interessieren uns hier an erster Stelle die Beziehungen, welche zwischen den Kalium- und Calciumionen bestehen, wobei die Natriumkonzentration zuerst unverändert bleiben soll. Die Unentbehrlichkeit beider Antagonisten zur Entgiftung einer m/4 NaCl-Lösung wird durch folgende Tabelle (Tabelle XIII) veranschaulicht. Für jeden Einzelversuch werden je zehn Exemplare von *Procerodes* verwendet.

Tabelle XIII (Versuch vom 24. Juli).

Lösung	Zustand der Tiere (nach 15 Stunden)
m/4 Na Cl	Abgestorben (schon nach wenigen Min.)
100 ccm m/4 Na Cl + 2 ccm m/4 $CaCl_2$	"
100 ccm m/4 Na Cl + 2 ccm m/4 K Cl .	"
m/4 Na-K-Ca-Lösung	Alle lebendig. Kriechen am Boden des Gefäßes (jedoch nicht so lebhaft wie im Seewasser)

Nachdem die Konzentrationsgrenzen von Kalium und Calcium in der äquilibrierten Lösung bestimmt wurden, konnten wir die Frage nach den physiologischen Abhängigkeiten zwischen diesen beiden Kationen in Angriff nehmen. In drei Versuchsserien (vom 26., 27. und 28. Juli) haben wir den Einfluß einer zehnfachen Verstärkung der KCl-Konzentration auf die Calciumschwelle untersucht. Eine solche Veränderung des Kaliumgehalts konnte keine irgendwie merkliche Verschiebung des zur Äquilibrierung erforderlichen Calciumminimums verursachen. Als Beispiel sei ein Versuch angeführt (s. Tabelle XIV); die beiden anderen haben ähnliche Resultate ergeben. Es soll jedoch bemerkt werden, daß bei *Procerodes* die Konzentrationsgrenzen nicht absolut konstant bleiben und daher nur in einer

Tabelle XIV (Versuch vom 27. Juli).

Calciumgehalt (ccm m/4 $CaCl_2$)	Ausgangslösung	
	100 ccm m/4 NaCl + 1 ccm m/4 KCl	100 ccm NaCl + 10 ccm KCl
0,5	Alle abgestorben	Alle abgestorben
1,0	Bei etwa drei Tieren werden am nächsten Tage schwache Kontraktionen bemerkbar; andere (7) sind unbeweglich	Etwa bei der Hälfte sind Kontraktionen bemerkbar
2,0	Mehrzahl lebendig. Schwache Bewegungen werden auf äußere Reizung hin oder auch spontan gemacht	Alle lebendig. Kriechen spontan oder auf Reizung hin am Boden des Gefäßes

und derselben Versuchsserie gewonnene Daten völlig miteinander vergleichbar sind.

Gleicherweise wurde auch die untere Kaliumgrenze untersucht. Wie aus Tabelle XV zu ersehen ist, üben auf dieselbe Veränderungen des Calciumgehalts gar keinen Einfluß aus, während dagegen eine Erniedrigung der Natriumkonzentration eine symbathe Verschiebung der Kaliumschwelle hervorruft. Es besteht also auch in diesem Falle kein Antagonismus zwischen den Kalium- und Calciumionen einer äquilibrierten Salzlösung. Die Kaliumionen wirken als selbständige, vom Calcium völlig unabhängige Antagonisten einer Komponente der Natriumgiftigkeit.

Tabelle XV (Versuch vom 31. Juli).

Kaliumgehalt (ccm m/4 KCl)	Ausgangslösung		
	100 ccm m/4 NaCl + 10 ccm m/4 $CaCl_2$	100 ccm m/4 NaCl + 2 ccm m/4 $CaCl_2$	100 ccm m/8 NaCl + 2 ccm m/4 $CaCl_2$
—	—	—	Abgestorben
0,25	Abgestorben	Abgestorben	Alle lebendig. Kriechen, die einen spontan, die anderen auf äußere Reizung hin
0,5	Abgestorben	Abgestorben	Alle kriechen umher — spontan oder auf äußere Reizung hin
1,0	Unbeweglich. Bei einigen Tieren treten auf mechanische Reizung schwache Reaktionen ein	Unbeweglich. Bei einigen Tieren schwache Reaktion auf mechanische Reizung	—

Ergebnisse.

Alle Organismen, die von uns einer vergleichend physiologischen Untersuchung unterworfen wurden, haben in ihren Grundzügen äußerst gleichartige Resultate ergeben. Bei zwei Krebstieren (*Diogenes varians Hell.* und *Porcellanides longimana Czern.*), einer Turbellarie (*Procerodes*

lobata D. Schm.), sowie der von uns früher untersuchten Polychäte (*Fabricia sabella Ehr.*), wurden vollkommen identische Beziehungen zwischen den Ionen der ternären Sälzlösung festgestellt; keine einzige Ausnahme ist uns in unseren Versuchen begegnet. Wir glauben uns daher schon jetzt berechtigt, diesen Beziehungen eine ganz allgemeine Bedeutung zuzuschreiben und die im Anfang dieser Arbeit gestellte Frage in folgender Weise zu beantworten.

Das Natriumchlorid bzw. das Natriumion übt auf die lebendigen Organismen zweierlei toxische Wirkungen aus. Die eine von ihnen wird durch Calcium-, die andere — ganz unabhängig davon — durch Kaliumionen unterdrückt. Dem Kalium kommt also die Aufgabe zu, die „sekundäre schädliche Wirkung" nicht des Calciums — wie Loeb es meinte —, sondern des Natriums zu beseitigen. Darauf ist seine Bedeutung in den zur Erhaltung des Lebens notwendigen äquilibrierten Salzlösungen zurückzuführen. Das Natriumchlorid ist in dem äußeren sowie inneren Lebensmilieu der meisten Organismen in einer Konzentration enthalten, welche zu seiner Entgiftung die Anwesenheit seiner beiden Antagonisten durchaus unentbehrlich macht. *Die universelle biologische Bedeutung des ternären Salzgemisches, der physiologisch äquilibrierten Na-K-Ca-Lösung, ist also durch die zweiartige Giftigkeit des Chlornatriums bedingt.*

Es sei hier ausdrücklich hervorgehoben, daß diese zweiartige Wirkungsweise des Natriums ausschließlich seine *Giftwirkung* anbetrifft. Auch die physiologische Rolle des Kaliums soll keineswegs in allen Fällen auf eine partielle Beseitigung der Natriumgiftigkeit beschränkt werden. Bei der Einwirkung der Ionen auf andere biologische Prozesse, insbesondere die *Erregbarkeit*, können Kaliumionen als Antagonisten auch dem Calcium entgegenwirken. Eine gegenseitige Äquilibrierung von Kalium und Calcium tritt z. B. bei ihrer Wirkung auf die Herztätigkeit deutlich hervor. Auch auf unsere eigenen Versuche über die antagonistischen Ionenbeziehungen bei der Kaliumstarre (bei *Fabricia*) können wir verweisen.

Wie ist es nun zu erklären, daß Beziehungen von einer so allgemeinen Gültigkeit nicht anerkannt wurden und bisher unbeachtet blieben? Es fehlte allerdings nicht ganz an Beobachtungen, die als Wegweiser dienen konnten. In seinen berühmten Versuchen an *Fundulus* hat nämlich *Loeb* die Möglichkeit festgestellt, die Giftigkeit einer letalen Chlorkaliumlösung durch Natrium-[1]), sowie durch Calciumsalze[2]) zu beseitigen, wobei „die höchste Konzentration von KCl, die durch $CaCl_2$ entgiftet werden kann, identisch ist mit der höchsten Konzentration von KCl, die noch durch NaCl entgiftet werden kann,

[1]) *Loeb,* diese Zeitschr. **31**, 450, 1911.
[2]) *Derselbe,* ebendaselbst **32**, 308, 1911.



nämlich 6,6 ccm m/2 KCl in 100 ccm der Lösung. Diese Zahl bleibt auch das Maximum, wenn man beide Stoffe, $CaCl_2$ und NaCl, gleichzeitig zur Entgiftung zufügt" (S. 322). Indem er diese Versuche zitiert, betont auch *Bayliss* als eine höchst bemerkenswerte Erscheinung, daß bei der Kaliumentgiftung durch Calcium wie durch Natrium „the antagonism is limited and *the interesting point about the fact is that the limit is the same*"[1]). Ganz anders verhalten sich aber die Antagonisten bei der Entgiftung des Natriums. „Wir stießen dabei zunächst", sagt *Loeb*[2]), „auf die merkwürdige Tatsache, daß KCl nur dann imstande ist eine entgiftende Wirkung auf NaCl auszuüben, solange die Konzentration von NaCl $^5/_8$ mol. nicht übersteigt; KCl unterscheidet sich in dieser Hinsicht von $CaCl_2$, das[3]) auch NaCl-Lösungen von höherer Konzentration als $^5/_8$ mol., nämlich selbst $^7/_8$ mol., zu entgiften imstande ist" (S. 482).

Im Lichte der hier erreichten Ergebnisse bietet die Deutung dieser scheinbar so rätselhaften Resultate keine Schwierigkeiten. Das Kalium besitzt eine einfache Giftwirkung. Läßt sie sich durch zwei verschiedene Salze unterdrücken, so ist zwischen ihnen ein vollständiger Synergismus zu erwarten, wie es auch bei unseren Versuchen über die Kaliumstarre der Fall war[4]). Der eine Antagonist kann dann selbstverständlich nicht mehr als der andere leisten. Anders verhält es sich mit dem Natrium. Seine zweiartige Giftigkeit zeigt sich in den Experimenten von *Loeb* mit einer besonderen Deutlichkeit, da die beiden Komponenten seiner toxischen Wirkung hier nicht gleichzeitig hervortreten. Unterhalb $^3/_8$ mol. ist eine NaCl-Lösung für *Fundulus* überhaupt unschädlich. Oberhalb dieser Konzentrationsschwelle macht sich zuerst (zwischen $^3/_8$ und $^1/_2$ oder $^5/_8$ mol.) die eine Giftigkeit geltend, die durch Kalium zu beseitigen ist. Erst bei einer weiteren Konzentrationssteigerung kommt noch ein zweiter Giftigkeitsfaktor hinzu, und wir gelangen dann zum gewöhnlichen ternären Salzgemisch: „Zur vollständigen Entgiftung einer NaCl-Lösung von der Konzentration m/2 oder darüber ist außer KCl auch der Zusatz von Ca erforderlich". Es eröffnet sich also hier die Möglichkeit, beide Komponenten der toxischen Natriumwirkung voneinander zu trennen und die eine von ihnen in einem bestimmten Konzentrationsintervall von der anderen zu isolieren. Für eine nähere Analyse der Natriumgiftigkeit und der Entgiftungsprozesse dürfte daher diese von *Loeb* entdeckte Erscheinung von besonderem Interesse sein. Unsere noch unveröffentlichten Beobachtungen lassen uns glauben, daß diese Erscheinung nicht vereinzelt dasteht.

---

[1]) *Bayliss*, Principles of general physiology, S. 213. London, 1915.
[2]) *Loeb*, diese Zeitschr. **33**, 480. 1911.
[3]) Bei Anwesenheit von KCl.
[4]) *Rubinstein*, l. c., S. 17.

Zusammenfassung.

1. Auf die verschiedenen von uns untersuchten Tiere (eine Turbellarie, eine Polychäte, zwei Krebstiere) übt das Natriumchlorid bzw. das Na-Ion zweierlei toxische Wirkungen aus.

2. In der gewöhnlichen physiologisch-äquilibrierten ternären Salzlösung (der „Na-K-Ca-Lösung") beseitigen die Kaliumionen eine toxische Wirkung des Natriums, während die andere von Calciumionen unterdrückt wird. Kalium sowie Calcium sind also beide Antagonisten des Natriums; ihre entgiftenden Wirkungen sind dabei vollkommen unabhängig voneinander und können sich im Gemisch nicht summieren.

3. Infolge der zweiartigen Giftigkeit des Natriums bedürfen alle Organismen, deren Gewebe von einer kochsalzhaltigen Flüssigkeit umspült sind (wie Seewasser und Blutplasma oder Gewebelymphe), zugleich der Kalium- und Calciumsalze. Dadurch ist die allgemeine Bedeutung der ternären physiologischen Salzlösung zu erklären.

Über die Sensibilisierung hydrophober Kolloide durch Eiweißstoffe.

Von

N. N. Andrejew.

(Aus der biochemischen Abteilung des Bakteriologischen Instituts „Pasteur“ zu Leningrad.)

(Eingegangen am 8. Januar 1927.)

Vor dem Erscheinen der Mitteilung von *Brossa* und *Freundlich*[1]), in der die Sensibilisierung hydrophober Kolloide durch hydrophile Eiweißstoffe behandelt wurde, lagen über diesen Gegenstand nur vereinzelte unsystematische Beobachtungen vor[2]).

Die Verfasser gelangten zu der Überzeugung, daß dieser Erscheinung eine Abnahme der Teilchenladung des hydrophoben Kolloids zugrunde liegt, die durch die Einwirkung entgegengesetzt geladener Kolloidionen des hydrophilen Kolloids, welche bei gewissen Versuchsbedingungen entstehen können, beeinflußt wird. So wird z. B. eine saure Lösung des kolloiden Goldes durch Gelatine und Eiweißstoffe koaguliert und sensibilisiert; in schwach alkalischer Lösung wird derselbe Effekt durch Clupeinsulfat hervorgerufen, dagegen nicht durch Gelatine. Die Fähigkeit der Eiweißstoffe, positive und negative Sole zu sensibilisieren, wird durch ihre Eigenschaft beeinflußt, in neutralen Lösungen sowohl Kationen als auch Anionen zu enthalten, mit anderen Worten, durch ihren amphoteren Charakter. Die bei Sensibilisierung im Gebiet der starken Elektrolytkonzentrationen auftretende Peptisationszone ist bei Abwesenheit von Eiweißstoffen nicht beobachtet worden, was sich durch die rasche Umwandlung der koagulierten Teilchen in gröbere Aggregate erklären läßt; dieser Vorgang wird durch Einwirkung der Eiweißstoffe gehemmt. Eben erwähnte Regelmäßigkeiten sind an dem System Fe_2O_3-Sol—Albumin studiert worden.

---

[1]) *Brossa* und *H. Freundlich*, Zeitschr. f. physik. Chem. **89**, 306, 1915; *H. Freundlich* und *Löning*, Kaiser Wilhelm-Gesellschaft-Festschrift 1921, S. 82.

[2]) *Henri, Lalon, A. Mayer, Stodel*, C. r. de la Soc. de Biol. **55**, 1671, 1903; *Friedemann*, Münch. med. Wochenschr. **51**, Nr. 11, 1903; *Gatin-Gruzewska*, C. r. de la Soc. de Biol. **58**, 698, 1906; *Wo. Pauli* und *Flecker*, diese Zeitschr. **41**, 470, 1912; *L. Michaelis* und *P. Rona*, ebendaselbst **2**, 219, 1907; **5**, 365, 1907.

Weitere Arbeiten behandeln andere Kolloidpaare: Kongorot — Lecithin[1]), Kongorot — Globulin[2]), immune und normale Eiweißstoffe — Fe_2O_3-Sol[3]) usw. In einigen Fällen ist es schwierig, die Versuchsergebnisse mit dem oben skizzierten allgemeinen Schema in Einklang zu bringen. So haben *Ettisch* und *Runge*[4]) u. a. festgestellt, daß die von *Brossa* untersuchten Sensibilisierungserscheinungen bei Kongorot — Globulin von der Wasserstoffionenkonzentration abhängen. *Krebs*[5]) hat beim Studium der Wechselwirkung zwischen einer sauren kolloiden Goldlösung einerseits und Eiweißstoff andererseits nicht eine Flockungszone, wie man hätte erwarten können, sondern deren zwei aufgefunden. Eine Erklärungsmöglichkeit für das Auftreten der einen findet er durch die Koagulation von Eiweißstoff, welcher Goldteilchen in den Niederschlag mit sich reißt.

Mein Mitarbeiter *A. Rabinerson* hat bei der Wechselwirkung zwischen Fe_2O_3-Sol einerseits und Albumin bzw. Globulin andererseits gleichfalls zwei Zonen beobachtet. Alle bei Sensibilisierungserscheinungen beobachteten Wechselbeziehungen, sowie auch die Bedeutung der Wasserstoffionenkonzentration erscheinen vollkommen klar und verständlich, sobald man sie vom Standpunkt der *Loeb*schen Theorie über den Bau der Verbindungen von Eiweißstoffen mit Elektrolyten betrachtet.

Nach den Anschauungen von *J. Loeb* läßt sich das Verhalten der Eiweißstoffe in Abhängigkeit von der Wasserstoffionenkonzentration durch folgende Formeln ausdrücken:

$$\bar{R}<\begin{matrix}NH_2\\COO\overset{+}{H}\end{matrix} \qquad R<\begin{matrix}NH_2\\COOH\end{matrix} \qquad \overset{+}{R}<\begin{matrix}NH_3\bar{Cl}\\COOH\end{matrix}$$

Nativer Eiweißstoff. Isoelektrischer Eiweißstoff. Saurer Eiweißstoff.

Nativer, von Elektrolyten befreiter Eiweißstoff erweist sich als eine schwach dissoziierte Säure mit kolloiden Anionen. Zusatz von stark dissoziierten Säuren ruft die Entstehung von nicht dissoziierten Eiweißstoffmolekülen hervor. Weitere Säurezugabe führt zur Bildung von Eiweißstoffsalzen, wobei der Eiweißstoff im Kation enthalten ist. Rein theoretisch kann man sich vorstellen, daß gerade diese Ionen bei der Einwirkung der Eiweißstoffe auf Kolloide eine überragende Rolle spielen werden. Die ausgeführten Versuche brachten in der Tat eine vollkommene Bestätigung dieser Annahme, wie aus den wiedergegebenen Resultaten ersichtlich ist.

---

1) *W. Beck*, diese Zeitschr. **159**, 471, 1925.

2) *Brossa*, Kolloid-Zeitschr. **32**, 107; *Reitstotter*, Zeitschr. f. Immun. **30**, 507, 1920.

3) *Reitstotter*, Zeitschr. f. Immun. **30**, 468, 1920; *H. Freundlich* und *W. Beck*, diese Zeitschr. **166**, 190, 1925.

4) *G. Ettisch* und *Runge*, Kolloid-Zeitschr. **37**, 26, 1925.

5) *Krebs*, diese Zeitschr. **159**, 311, 1925.

Versuch 1.

Es wurden je 2 ccm Berlinerblausol (Gehalt: 1 ccm 0,0005 g) mit HCl enthaltender protalbinsaurer Na-Lösung vermischt. Das Gesamtvolumen betrug stets 3 ccm (1 ccm Lösung enthält protalbinsaures Na 0,0048 g, HCl 0,0078 g).

Protalbinsaures Na mit HCl 0,050 ccm. Keine Koagulation. Gesamtgehalt Eiweißstoff 0,000 24 g, HCl 3,6 Millimol.

Protalbinsaures Na mit HCl 0,070 ccm. Teilweise koaguliert. Gesamtgehalt Eiweißstoff 0,000 33 g, HCl 4,8 Millimol.

Protalbinsaures Na mit HCl 0,10 ccm. Vollständige Koagulation. Gesamtgehalt Eiweißssoff 0,000 48 g, HCl 7,3 Millimol.

Protalbinsaures Na mit HCl 0,50 ccm. Vollständige Koagulation. Gesamtgehalt Eiweißstoff 0,002 40 g, HCl 36,0 Millimol.

Protalbinsaures Na mit HCl 1,00 ccm. Teilweise koaguliert. Gesamtgehalt Eiweißstoff 0,004 80 g, HCl 73,0 Millimol.

Protalbinsaures Na mit HCl 2,00 ccm. Keine Koagulation. Gesamtgehalt Eiweißstoff 0,009 60 g, HCl 146,0 Millimol.

Die kolloidalen Berlinerblauteilchen sind negativ geladen. Der Eiweißstoff bildet mit Säure Ionen von dem Typus $\overset{+}{R}<^{NH_3Cl^-}_{COOH}$. 0,05 ccm der oben erwähnten Eiweißstofflösung enthalten eine zur Koagulation nicht ausreichende Menge von Ionen; die vollständige Flockung beginnt bei 0,1 ccm Lösung, 2,0 ccm enthalten so viel positiv geladene Eiweißstoffionen, daß sie eine Umladung der Berlinerblauteilchen bewirken. Betrachten wir in diesem Versuch die HCl-Konzentration, die zur Berlinerblaukoagulation in Gegenwart von Eiweißstoff erforderlich ist, so ist ersichtlich, daß die HCl-Einwirkung auf Berlinerblausole durch die Anwesenheit von Eiweißstoff sensibilisiert wird. So koaguliert das Berlinerblausol ohne Eiweißstoff von 370 Millimol HCl an, in Gegenwart aber von 0,000 24 g Eiweißstoff (19 Proz. des Gesamtgehalts an Kolloiden in der Lösung) schon von 3,6 Millimol HCl an. Größere Mengen von Eiweißstoff rufen „Schutzwirkungen" hervor und steigern somit die zur Koagulation notwendige HCl-Konzentration.

Versuch 2.

Es wurden je 2 ccm Berlinerblausol (Gehalt: 1 ccm 0,0005 g) mit einer HCl enthaltenden Albuminlösung vermischt. (Die Konzentration entspricht der oben erwähnten Lösung.) Das Gesamtvolumen der Lösung betrug stets 3 ccm.

Albumin mit	HCl	0,0125	cm.	Keine Koagulation.
,, ,,	HCl	0,0250	,,	Trübung.
,, ,,	HCl	0,0500	,,	Vollständige Koagulation.
,, ,,	HCl	0,1000	,,	,, ,,
,, ,,	HCl	0,5000	,,	Teilweise koaguliert.
,, ,,	HCl	1,000	,,	,, ,,
,, ,,	HCl	2,000	,,	Keine Koagulation.

Versuch 3.

Es wurde je 1 ccm Fe_2O_3-Sol mit verschiedenen Mengen 0,1 proz. protalbuminsaurer Na-Lösung vermischt. Das Gesamtvolumen der Mischungen betrug 2,5 ccm.

0,1 proz.	protalbinsaures	Na	0,25 ccm.	Keine Koagulation.
0,1 ,,	,,	Na	0,50 ,,	Vollständige Koagulation.
0,1 ,,	,,	Na	1.00 ,,	Teilweise koaguliert.
0,1 ,,	,,	Na	1,50 ,,	Keine Koagulation.

Versuch 4.

Fe_2O_3-Sol und Albumin in denselben Konzentrationen.

0,1 proz.	Albumin	0,25 ccm.	Keine Koagulation.
0,1 ,,	,,	0,50 ,,	,, ,,
0,1 ,,	,,	1,00 ,,	,, ,,
0,1 ,,	,,	1,50 ,,	Schwache Trübung.
1 ,,	,,	0,2 ,,	Starke ,,
1 ,,	,,	0,4 ,,	Vollständige Koagulation.
1 ,,	,,	0,5 ,,	Teilweise koaguliert.
1 ,,	,,	1,0 ,,	Keine Koagulation.

Die kolloidalen Fe_2O_3-Teilchen sind positiv geladen. Der Eiweißstoff bildet Ionen von der Art $\overset{-}{R}<^{NH_2}_{COO}\overset{+}{Na}$ oder $\overset{-}{R}<^{NH_2}_{COO}\overset{+}{H}$, je nachdem er in protalbinsaurer Na-Lösung oder in Albuminlösung gelöst ist. Wie im Versuch mit Berlinerblausol, weist die Koagulation auch hier ein Maximum auf, überdies erfolgt eine durch einen Überschuß an Eiweißstoffionen hervorgerufene Umladung der Fe_2O_3-Teilchen.

Anscheinend ist die von *Krebs* und *Rabinerson* beobachtete Koagulation von zwei Zonen, die bei der Wechselwirkung zwischen Gold- bzw. Fe_2O_3-Sol in Gegenwart von Eiweißstoff einerseits und NaCl andererseits auftritt, ebenfalls auf die Gegenwart von Eiweißstoffionen zurückzuführen. Eine Bestätigung dieser Vorstellung liefern die folgenden Versuche.

Versuch 5.

Es wurde je 1 ccm Fe_2O_3-Sol mit verschiedenen Mengen Albuminlösung vermischt. Das Gesamtvolumen betrug stets 2,5 ccm. 1 Stunde später wurden in die Mischung 0,16 ccm NaCl-Lösung hineinpipettiert. Die Konzentration derselben betrug nach der Vermischung 95 Millimol.

0,1 proz. Albumin 0,25 ccm. Keine Koagulation. 0,16 ccm NaCl. Teilweise koaguliert.

0,1 proz. Albumin 0,50 ccm. Keine Koagulation. 0,16 ccm NaCl. Vollständige Koagulation.

0,1 proz. Albumin 1,0 ccm. Keine Koagulation. 0,16 ccm NaCl. Unvollständige Koagulation.

0,1 proz. Albumin 1,5 ccm. Schwache Trübung. 0,16 ccm NaCl. Teilweise koaguliert.

1 proz. Albumin 0,2 ccm. Teilweise koaguliert. 0,16 ccm NaCl. Keine Koagulation.

1 proz. Albumin 0,4 ccm. Vollständige Koagulation. 0,16 ccm NaCl. Vollständige Koagulation.

1 proz. Albumin 0,5 ccm. Teilweise koaguliert. 0,16 ccm NaCl. Teilweise koaguliert.

1 proz. Albumin 1,0 ccm. Keine Koagulation. 0,16 ccm NaCl. Keine Koagulation.

Versuch 6.

Der Versuch unterscheidet sich von dem vorhergehenden nur durch die Reihenfolge des Zusatzes. Die Albuminlösung wurde in verschiedenen Mengen mit NaCl-Lösung vermischt, das Gesamtvolumen ausgeglichen und alsdann Fe_2O_3-Lösung hinzugefügt.

0,1	proz.	Albumin	0,25	ccm.	Teilweise koaguliert.
0,1	„	„	0,5	„	Vollständige Koagulation.
0,1	„	„	1,0	„	„ „
0,1	„	„	1,5	„	Teilweise koaguliert.
1	„	„	0,2	„	Trübung.
1	„	„	0,4	„	Keine Koagulation.
1	„	„	0,5	„	„ „
1	„	„	1,0	„	„ „

Im Versuch 5 enthält der native Eiweißstoff als schwach dissoziierte Säure anscheinend eine geringe Menge von $\bar{R}<^{NH_2}_{COO}\overset{+}{H}$-Ionen, welche durch die Einwirkung der im Fe_2O_3-Sol befindlichen HCl noch verkleinert wird, und die Koagulation beginnt erst bei 0,4 ccm 1 proz. Albumin; weitere Zugabe von Albuminlösung unterbricht die Koagulation, weil bei 1 ccm Albuminlösung die Eiweißstoffanionenmenge zur Umladung (und infolgedessen zur Peptisation) ausreicht. Zugefügtes NaCl ergibt, nach *Loeb*, mit dem nativen Eiweißstoff $\bar{R}<^{NH_2}_{COO}\overset{+}{Na}$, ein stark dissoziiertes Salz, daher kann das Koagulationsmaximum schon bei 0,5 ccm 0,1 proz. Albumin beobachtet werden. Der durch 0,4 ccm 1 proz. Albumin entstandene Niederschlag kann aber durch 93 Millimol NaCl nicht aufgelöst werden[1]). Wenn aber NaCl (wie im Versuch 6) schon früher hinzugesetzt war, so bildet sich sogleich ein Niederschlag, wenn die Menge der zugefügten Albuminlösung

[1]) Die Unlöslichkeit der ausgefallenen Niederschläge hängt mit der Zeit und Art ihrer Bildung zusammen. Die durch einmalige Zufügung des notwendigen Koagulationsquantums gebildeten Niederschläge lassen sich unter gewissen Bedingungen auflösen, während die durch anteilweise Zufügung erhaltene Niederschläge ihre Löslichkeit verlieren. Unlöslichkeit ist auch dann zu beobachten, wenn die Niederschläge längere Zeit nach ihrer Bildung der Wirkung des Lösungsmittels unterworfen werden. Diese Erscheinung wird gegenwärtig in meinem Laboratorium eingehend untersucht.



0,5 ccm beträgt, der zweite Niederschlag bei 0,4 ccm 1proz. Albuminlösung bleibt völlig aus, der in der Lösung vorhandenen Ionenkonzentration entsprechend.

Vom hier besprochenen Standpunkte aus kann die Sensibilisierung bei der Behandlung negativer Sole mit den nativen Eiweißstoffen nicht stattfinden. Der Eiweißstoff kann ohne Säurezusatz keine Eiweißstoffkationen bilden und keine Umladung negativer Kolloidteilchen hervorrufen. Das Verschwinden der Sensibilisierungserscheinung bei Globulin und Kongorot im p_H-Gebiet = 6,9 bis 7,1 bestätigt, wie aus den Versuchen von *Ettisch* und *Runge*[1]), sowie aus der Untersuchung von *A. Rabinerson*[2]) mit Ag-Sol und Eiweißstoffen, in der nur Schutzwirkungen beobachtet wurden, leicht ersichtlich ist, die oben erwähnte Vorstellung; eine Stütze bieten auch die Ergebnisse des Versuchs 7 mit Berlinerblausol und Albumin.

Versuch 7.

Es wurden je 1 ccm Berlinerblausol (0,001 g in 1 ccm) mit Albuminlösung verschiedener Konzentrationen vermischt und der Mischung KCl-Lösung derart beigefügt, das seine Konzentration in den Gemischen 75 Millimol betrug. Das Gesamtvolumen der Mischungen belief sich stets auf 2 ccm.

Prozentgehalt des Albumins auf den Gesamtgehalt der Kolloide in Mischung bezogen	Koagulation
20	Keine Koagulation
9	Sehr schwache Koagulation
4,7	Schwache Koagulation
2,4	Nicht vollständige Koagulation
1	Nicht vollständige Koagulation (stärker als die vorhergehende)
0,5	Fast vollständige Koagulation
0,25	Vollständige Koagulation
—	„ „

Wie aus den Versuchen zu ersehen ist, beeinflussen 75 Millimol KCl eine vollständige Koagulation von Berlinerblau ohne Albuminzusatz; 0,25 Proz. Albumin, auf den Gesamtgehalt der in Lösung befindlichen Kolloide bezogen, bewirken eine Veränderung des Koagulationsgrades, welche unter gewöhnlichen Bedingungen nicht beobachtet werden kann. Stärkere Albuminkonzentrationen erniedrigen den Koagulationsgrad, d. h. sie erhöhen die Beständigkeit des Berlinerblausols oder „schützen" es.

Somit führen die Angaben in der Literatur und die beschriebenen Versuche zu folgenden Schlüssen:

1. Der native Eiweißstoff enthält nur Eiweißstoffanionen, die in gewissen Konzentrationen eine Koagulation positiv geladener Sole

[1]) *G. Ettisch* und *Runge*, Kolloid-Zeitschr. **37**, 26, 1925.

[2]) *A. Rabinerson*, ebendaselbst **39**, 112.



hervorrufen. In kleineren Konzentrationen sensibilisieren die Eiweißstoffanionen das Kolloid zu Neutralsalzen, weil letztere eine Bildung größerer Mengen dieser Anionen hervorrufen, da die Eiweißstoffsalze stärker dissoziiert sind als Eiweißstoffe in Form von Säuren. In stärkeren Konzentrationen laden sie das Kolloid um und verleihen ihm eine größere Beständigkeit (Schutzwirkung).

2. Der native Eiweißstoff ruft keine Flockung und keine Sensibilisierung der negativ geladenen Kolloide hervor, weil er nur Eiweißstoffanionen enthält. Falls er im nötigen Überschuß hinzugefügt ist, so kann er, dank seiner stark adsorbierbaren Anionen, die Beständigkeit der gleichnamig geladenen Sole erhöhen (Schutzwirkung).

3. Angesäuerter Eiweißstoff enthält Eiweißstoffkationen, weil er in gewissen Konzentrationen koagulierend und in stärkstem Grade umladend auf die negativen Sole wirkt.

Die Rolle der Begleitstoffe bei der Immunisierung mit Peroxydasepräparaten.

Von

A. Samysslow.

(Aus dem Biochemischen Institut und der Biochemischen Abteilung des Staatlichen Instituts für experimentelle Veterinärie in Moskau.)

(Eingegangen am 8. Januar 1927.)

Die Frage danach, ob die Fermente als solche antigene Eigenschaften besitzen, ist noch immer ungeklärt.

Die meisten Forscher sind der Meinung, daß es keine Antifermente im eigentlichen Sinne des Wortes gibt.

So ist z. B. *Bayliss* (1) geneigt, die hemmende Wirkung des Serums nach der Behandlung von Tieren mit Fermentflüssigkeit entweder Versuchsfehlern oder unzureichender Reinigung des Ferments von Eiweißstoffen zuzuschreiben. Zu derselben Ansicht gelangten später *Abderhalden* und *Wertheimer* (2), *Lüers* und *Albrecht* (3), *Knaffl-Lenz* (4), wie auch *A. Bach* und seine Mitarbeiter (5) (6). In vorliegender Arbeit wird über die Fortsetzung einer Reihe von Untersuchungen berichtet, die in dieser Richtung im Biochemischen Institut ausgeführt wurden.

Bach und Mitarbeiter erklären die von ihnen beobachtete Tatsache, daß enzymologisch unspezifische Fermente je nach der Herkunft streng spezifische Sera liefern können, durch die Anahme, daß als Antigen nicht das aktive Fermentmolekül, sondern die mit ihm vergesellschafteten Begleitstoffe fungieren. Im Maße der Befreiung von diesen Begleitstoffen müßte das Ferment seine antigenen Eigenschaften allmählich einbüßen. Diese Voraussetzung wurde in gewissem Maße an der Hand von Immunisierungsversuchen mit Invertasepräparaten nachgewiesen (5). Durch geeignete Reinigung von Hefenautolysesaft gelang es, die antigene Fähigkeit des Präparats bedeutend herabzusetzen, ohne die Fermentaktivität zu beeinträchtigen. Aus Nachstehendem geht hervor, daß ein anderes Ferment, die Peroxydase aus Meerrettich, durch ähnliche Reinigung seiner antigenen Eigenschaften vollständig beraubt werden konnte. Weiterhin wurde sowohl im ersteren wie auch im letzteren Falle festgestellt, daß die Inaktivierung des

Ferments durch Erhitzen keine Verringerung der antigenen Wirkung der Fermentflüssigkeit zur Folge hat. Dieser Umstand bestätigt ebenfalls, daß die antigenen Eigenschaften der Fermentflüssigkeit nicht dem aktiven Enzym, sondern eiweißartigen, oder, allgemeiner, kolloiden Begleitstoffen (*Willstätters* „Kolloidträger") zukommen. Die Versuche ergaben weiter, daß Immunsera, die durch Immunisierung mit nicht gereinigter und gekochter Fermentflüssigkeit erhalten wurden, weder auf das nichtgereinigte, noch auf das gereinigte Ferment einwirken.

In vorliegender Arbeit wurde die antifermentative Wirkung der Immunsera mittels zweier Verfahren untersucht. Nach dem ersten wurde die hemmende Wirkung der Immunsera in Lösung bestimmt; das zweite diente zur Ermittlung der Bindungsfähigkeit der Immunsera gegenüber dem Ferment. Die negativen Resultate der Immunisierung mit gereinigten Fermentpräparaten bestätigen nochmals die in früheren Arbeiten (5, 6) ausgesprochene Annahme, daß die hemmende Wirkung der Immunsera sekundärer Natur sei und darin bestehe, daß das Ferment in den beim Zusammentreffen von Antigen und Antikörper sich bildenden Komplex mitgerissen und dadurch teilweise inaktiviert werde.

In keinem Falle läßt sich die hemmende Wirkung durch Verschiedenheiten in der Wasserstoffionenkonzentration erklären, denn alle Versuche wurden in Pufferlösungen ausgeführt. Letzterer Umstand ist offenbar dem Referenten der *Kolloid-Zeitschrift* (7) entgangen.

Allgemeine Methodik.

Als Versuchstiere wurden im ganzen 12 Kaninchen verwendet. Das Antigen wurde in Intervallen von 5 bis 6 Tagen in einer Menge von 1 ccm pro Kilogramm Körpergewicht in die Ohrvene der Tiere eingeführt. Jedes Kaninchen erhielt fünf bis sechs Injektionen. Zur Untersuchung der antifermentativen Eigenschaften der Sera dienten folgende zwei Verfahren.

Erstes Verfahren: 1 ccm auf das Zehnfache verdünnten Serums + 1 ccm verdünnter Fermentflüssigkeit + 2 ccm Acetatpuffer (n/10, 1 : 8) wurden eine halbe Stunde lang im Thermostaten bei 37° stehengelassen. Sodann kamen zu dem Gemisch 1 ccm Guajakollösung (0,1 proz.), 5 ccm destilliertes Wasser und im letzten Augenblick 1 ccm 0,05 proz. H_2O_2-Lösung. Das Gesamtvolumen betrug also stets 10 ccm. Nach 15 Minuten langem Stehenlassen im Dunkeln bei Zimmertemperatur wurde die Flüssigkeit im *Autenrieth*schen Kolorimeter direkt auf ihren Gehalt an oxydiertem Guajakol untersucht. Die Vergleichslösung wurde nach Angabe von *W. Engelhardt* hergestellt (2,4 Teile 5 proz. Kaliumbichromatlösung auf 100 Teile 10 proz. Kobaltnitratlösung, entsprechend verdünnt).

Das zweite Verfahren ist dasjenige des fixierten (adsorbierten) Antikörpers (9). Es beruht auf der Fähigkeit des Kaolins, die Eiweißstoffe des Serums zu adsorbieren, darunter auch diejenigen, von denen die Antikörpereigenschaften des Serums abhängen (vgl. *A. Bach*, *W. Engelhardt* und *A. Samysslow*). Dieses Verfahren wurde folgenderweise angewendet. 1 ccm auf das Zehnfache verdünnten Serums + 1 ccm Acetatpuffer wurden 10 Minuten lang mit 1 ccm 5 proz. Kaolinsuspension stehengelassen. Sodann



wurde das Gemisch zentrifugiert, die Flüssigkeit abgegossen und der Niederschlag in 1 ccm verdünnter Fermentflüssigkeit + 2 ccm Acetatpuffer abgeschwemmt und eine halbe Stunde bei Zimmertemperatur stehengelassen. Besaß das Serum antigene Eigenschaften, so erfolgte Bindung des Ferments an den Niederschlag; im entgegengesetzten Falle blieb das Ferment in Lösung. Das Gemisch wurde nun von neuem zentrifugiert und die überstehende Flüssigkeit in üblicher Weise auf ihren Fermentgehalt untersucht (Guajakol- und H_2O_2-Mengen, sowie Gesamtvolumen wie beim ersten Verfahren). Als Kontrolle dienten in beiden Verfahren Versuche mit normalem Serum, die gleichzeitig unter genau den gleichen Bedingungen angestellt wurden. Zum zweiten Verfahren ist zu bemerken, daß auf verschiedene Weise hergestelltes Kaolin ungleiche Adsorptionsfähigkeit aufweist. Es muß deswegen für jede Sorte Kaolin durch Vorversuche die Menge festgestellt werden, die zur vollständigen Adsorption der Eiweißstoffe (z. B. aus 0,1 ccm Serum) erforderlich sind. Reines Kaolin ohne Serum adsorbiert in der von uns angewandten Menge ungereinigte Peroxydase nur in ganz geringem Maße. Deswegen sind, obwohl die entsprechende Kontrolle jedesmal ausgeführt wurde, die zugehörigen Zahlen nicht in die nachstehenden Tabellen aufgenommen worden.

Immunisierung mit ungereinigtem Peroxydasepräparat.

Als Antigen diente ein wässeriger Auszug aus den Wurzelstöcken des Meerrettichs, der auf folgende Weise hergestellt wurde.

3 kg Meerrettich wurden 24 Stunden in Leitungswasser mazeriert. Nach Abschaben der Haut wurden die Wurzelstöcke in dünne Scheibchen zerschnitten und 6 Tage lang gegen fließendes Wasser dialysiert [vgl. *Willstätter* und *Stoll* (8)]; sodann wurden sie in einer gewöhnlichen Fleischhackmaschine zerkleinert. Der erhaltene Brei wurde mit destilliertem Wasser angerührt und eine Woche lang unter Toluol stehengelassen. Darauf wurde die fermenthaltige Flüssigkeit mittels einer Handpresse ausgepreßt. Die anfänglich trübe Flüssigkeit klärte sich nach zweitägigem Stehen durch Absetzen der unlöslichen Zellelemente. Die klare Flüssigkeit wurde zur Immunisierung und zur Herstellung des gereinigten Ferments verwendet.

Die Kaninchen erhielten 1 ccm dieser Flüssigkeit pro 1 kg Körpergewicht. Zu den Versuchen mit dem Serum wurde die Stammlösung auf das 300fache mit destilliertem Wasser verdünnt. 1 ccm dieser Verdünnung gab unter den beschriebenen Versuchsbedingungen in 15 Minuten bei Zimmertemperatur etwa 0,190 mg oxydiertes Guajakol. Die Resultate der Immunisierung sind in folgenden Tabellen zusammengestellt. In sämtlichen Tabellen bedeuten die Zahlen die Menge oxydierten Guajakols in Milligrammen.

Erstes Verfahren.

Wirkung des Immunserums in Lösung.

Kaninchen Nr.	Normalserum	Immunserum nach 5 Injektionen
1	—	—
2	0,180	0,115
3	0,210	0,138
4	0,210	0,146



Zweites Verfahren.

Wirkung des Immunserums in adsorbiertem Zustande.

Kaninchen Nr.	Normalserum	Immunserum nach 3 Injektionen	Normalserum	Immunserum nach 5 Injektionen
1	0,180	0,164	0,180	0,138
2	0,173	0,098	0,180	0,037
3	0,188	0,050	0,188	0
4	0,190	0,090	0,188	0,037

Aus den Tabellen ist ersichtlich, daß das Serum mit ungereinigter Peroxydaseflüssigkeit behandelter Kaninchen die Fähigkeit erwirbt, die Wirkung der Peroxydase zu hemmen. Die hemmende Wirkung nimmt mit der Anzahl der Injektionen zu.

Immunisierung mit gekochter Fermentflüssigkeit.

Der oben beschriebene Meerrettichextrakt wurde auf dem Wasserbade gekocht. Nachdem die Flüssigkeit eine halbe Stunde lang in siedendem Wasser erhitzt wurde, bildete sich ein Niederschlag. Die abfiltrierte Flüssigkeit wies noch eine schwache Peroxydasewirkung auf. Die Flüssigkeit wurde abermals eine Stunde lang auf dieselbe Weise erhitzt; dabei verschwanden ihre fermentativen Eigenschaften vollständig. In diesem Zustande wurde die Flüssigkeit zur Immunisierung verwendet; dabei wurde vor jeder Injektion durch einen Kontrollversuch die Abwesenheit von Peroxydase gesichert. Es erwies sich, daß die Sera von zwei mit gekochter Fermentflüssigkeit immunisierten Kaninchen gegen aktives Ferment wirksam waren.

Erstes Verfahren. Serum in Lösung.

Kaninchen Nr.	Normalserum	Immunserum nach 5 Injektionen
5	0,210	0,146
6	0,210	0,159

Zweites Verfahren. Serum adsorbiert.

Kaninchen Nr.	Normalserum	Immunserum nach 3 Injektionen	Normalserum	Immunserum nach 5 Injektionen
5	0,190	0,039	0,188	Spuren
6	0,190	0,070	0,178	0,044

Aus den Tabellen ist ersichtlich, daß durch Zerstörung des Ferments durch Erhitzen die antigenen Eigenschaften der Flüssigkeit nicht verringert werden. Das Auftreten antifermentativer Eigenschaften im Serum wird augenscheinlich nicht durch den aktiven Anteil des Ferments bewirkt, sondern durch andere, mit dem Ferment assoziierte Stoffe. Allem Anschein nach ist die antigene Wirksamkeit der Ferment-

flüssigkeit gewissen, schwer vom Ferment zu trennenden Begleitstoffen zuzuschreiben.

Diese Vermutung wird durch die weiteren Versuche der Immunisierung mit gereinigtem Ferment bestätigt.

Bevor wir zu diesen Versuchen übergehen, möchten wir noch darauf hinweisen, daß in dem beim Versuch nach dem zweiten Verfahren erhaltenen Niederschlag aus Kaolin, Serumeiweiß und gebundenem Ferment letzteres seine Wirksamkeit, wenn auch in abgeschwächtem Maße, beibehält. Wie aus nachstehender Tabelle ersichtlich, tritt unter diesen Bedingungen mit Normalserum praktisch keine Adsorption des Ferments auf.

Kaninchen Nr.	Nach 5 Injektionen	
	Niederschlag mit Normalserum	Niederschlag mit Immunserum
1	0	0,114
2	Spuren	0,070
3	0	0,094
4	Spuren	0,088

Immunisierung mit gereinigtem Fermentpräparat.

Der wässerige Auszug aus Meerrettich wurde folgender Bearbeitung unterworfen.

1500 ccm des Extrakts wurden mit 200 ccm kalt gesättigter Sublimatlösung versetzt. Der ausfallende, ziemlich voluminöse Niederschlag wurde abfiltriert und durch die Flüssigkeit 20 Minuten lang Schwefelwasserstoff durchgeleitet. Die abermals filtrierte Flüssigkeit wurde mit dem sechsfachen Volumen 96proz. Alkohols gefällt (vgl. *Willstätter* und *Stoll*, l. c.). Nach der Sedimentierung der ausfallenden Flocken wird die alkoholisch-wässerige Lösung dekantiert und der Niederschlag in 200 ccm destillierten Wassers gelöst. Die so erhaltene gelbliche Fermentlösung wurde zur Immunisierung verwendet. Die Lösung gab weder die Biuretreaktion noch eine Fällung mit dem *Spiegler*schen Reagens. Die Kaninchen erhielten 1 ccm dieser Lösung pro 1 kg Körpergewicht.

Zu den Versuchen mit dem Serum wurden Verdünnungen von 1 : 1000 angewandt.

In den folgenden Tabellen sind die Resultate der Immunisierung wiedergegeben.

Zweites Verfahren. Serum adsorbiert.

Kaninchen Nr.	Normalserum	Immunserum nach 5 Injektionen
7	0,123	0,118
8	0,125	0,125
9	0,188	0,188
10	0,188	0,188
11	0,188	0,186
12	0,190	0,188

Die Aktivität der zur Immunisierung verwendeten gereinigten Fermentlösung war dreimal so stark wie die des ungereinigten Ausgangsprodukts. Dessenungeachtet gelang es nicht, im Serum der Versuchstiere eine Spur von Immuneigenschaften nachzuweisen. Aus diesen Versuchen geht hervor, daß das Ferment an und für sich kein Antigen ist, es kann jedoch auch nach Verlust seiner antigenen Wirksamkeit die Immunitätsreaktion mit Seren geben, die bei der Immunisierung von Kaninchen mit ungereinigter und sogar mit gekochter Fermentlösung erhalten wurden. Nachstehende Tabelle läßt dieses deutlich ersehen.

Zweites Verfahren.

Immunisierung mit ungereinigter, Prüfung der Sera mit gereinigter Peroxydase.

Kaninchen Nr.		Normalserum	Immunserum nach 5 Injektionen
2	Immunisierung mit aktivem ungereinigten Präparat	0,180	0,042
3		0,180	0
4		0,180	0,068
5	Immunisiert mit gekochtem Präparat	0,180	Spuren
6		0,180	0,042

Es ist möglich, daß die antigenen Eigenschaften von einem Komplex aus Eiweißstoffen und dem „Kolloidträger" *Willstätters*, des Fermentmoleküls, abhängen. Es wäre interessant, Komplexe aus gereinigtem Ferment und wohldefinierten Eiweißstoffen darzustellen und Tiere mit solchen Gemischen zu immunisieren. Möglicherweise könnten dabei im Serum antifermentative Eigenschaften auftreten, die den im vorangehenden beschriebenen ähnlich sind. In der Literatur über Immunität wird über ähnliche Erscheinungen berichtet, die als heterogene oder Partialantigene oder Haptene *Landsteiners* bezeichnet werden.

Zusammenfassung.

1. Die parenterale Einführung von wässerigem Extrakt aus den Wurzelstöcken des Meerrettichs bewirkt bei Kaninchen das Auftreten antiperoxydatischer Eigenschaften im Serum.

2. Die antifermentativen Eigenschaften der Sera äußern sich in Bindung der Peroxydase und Hemmung ihrer Wirkung.

3. Durch Immunserum gebundene Peroxydase behält im gebundenen Zustande teilweise ihre Wirksamkeit.

4. Durch Kochen werden die Antigeneigenschaften der ungereinigten Fermentflüssigkeit nicht abgeschwächt; es werden dabei Sera erhalten, die nicht minder wirksam sind als die bei der Immunisierung mit aktiver ungereinigter Fermentflüssigkeit erhaltenen.



5. Weitgehende Reinigung der Fermentflüssigkeit führt zum Verlust der antigenen Eigenschaften bei intakter Fermentaktivität.

6. Die unter 4. und 5. angeführten Ergebnisse berechtigen zu der Annahme, daß der aktive Anteil des Ferments nicht als Antigen angesprochen werden kann.

Literatur.

1) *W. M. Bayliss*, The nature of enzyme action. 1919. — 2) *E. Abderhalden* und *E. Wertheimer*, Fermentforschung **6**, 286, 1923. — 3) *H. Lüers* und *F. Albrecht*, ebendaselbst **8**, 52, 1923. — 4) *E. Knaffl-Lenz*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **120**, 110, 1922. — 5) *A. Bach* und *W. Engelhardt*, diese Zeitschr. **148**, 456, 1924. — 6) *A. Bach*, *W. Engelhardt* und *A. Samysslow*, ebendaselbst **160**, 261, 1925. — 7) Kolloid-Zeitschr. **38**, 352, 1926. — 8) *Willstätter* und *Stoll*, Liebigs Ann. d. Chem. **416**, 21, 1918. — 9) *W. Engelhardt*, diese Zeitschr. **148**, 463, 1924.

Über die Kohlenstoffausbeute bei der Photosynthese unter natürlichen Verhältnissen.

Von

S. Kostytschew, K. Bazyrina und **G. Wassilieff.**

(Aus dem Laboratorium für Biochemie der Pflanzen der russischen Akademie der Wissenschaften und dem Peterhofschen Forschungsinstitut.)

(Eingegangen am 8. Januar 1927.)

Sachs[1]) war wohl der erste, der die überaus wichtige Frage der quantitativen Ausbeute an organischen Stoffen bei der Photosynthese der chlorophyllführenden Pflanzen einer eingehenden Betrachtung unterzog und auch experimentell zu lösen versuchte. Unter Anwendung seiner bekannten „Blatthälftenmethode" hat der genannte Forscher die ersten Untersuchungen über den täglichen Stoffgewinn der Laubblätter verschiedener Pflanzen ausgeführt und gelangte zu folgenden Ergebnissen: Unter Berücksichtigung der Stoffauswanderung aus dem Blatte ergibt sich als maximaler Assimilationswert pro Quadratmeter der Blattfläche in einer Stunde 1,8 g für Helianthus annuus und 1,5 g für Cucurbita pepo.

Diese enorm hohen Zahlen wurden von *Brown* und *Escombe*[2]) durch ihre direkte Methode der CO_2-Bestimmung im Luftstrom nicht bestätigt. Nach den Angaben der britischen Forscher wird der Assimilationswert verschiedener Pflanzen durch folgende Zahlen ausgedrückt:

Pflanze	Ausbeute (als Zucker ber.) g
Helianthus annuus	0,359—0,551
Tropaeolum majus	0,166—0,305
Polygonum Weyrichii . .	0,347—0,593
Catalpa bignoioides . . .	0,468
Petasites albus	0,359

[1]) *J. Sachs*, Arb. d. bot. Inst. in Würzburg **3**, 1, 1884.
[2]) *H. T. Brown* and *F. Escombe*, Proc. of the Roy. Soc. of London (B) **76**, 29, 1905.

Zahlen, welche sich auf die verschiedenen Pflanzen beziehen, können miteinander nicht verglichen werden, da die Versuche unter sehr ungleichen äußeren Verhältnissen ausgeführt worden waren; trotzdem ergibt sich aus sämtlichen Zahlen das folgende eindeutige Resultat: Die Ausbeuten waren in den Versuchen von *Brown* und *Escombe* im Durchschnitt drei- bis fünfmal niedriger als in Versuchen von *Sachs*. Die Untersuchungen von *Giltay*[1]) ergaben Zahlen von derselben Ordnung. Dieser Forscher arbeitete ebenfalls im Luftstrom. Nachstehend sind einige Angaben *Giltays* über die CO_2-Verarbeitung auf einfache Zucker umgerechnet:

Pflanze	Ausbeute g
Helianthus annuus	0,381
" "	0,491
Nicotiana rustica	0,314
" "	0,423
Cedrella serrulata	0,573
Acalypha tricolor	0,477

Zahlen von derselben Größenordnung finden sich auch in der Arbeit von *Boysen-Jensen*[2]), der ebenfalls im Strome der atmosphärischen Luft experimentierte.

Auf den ersten Blick scheint die oben dargelegte Kontroverse einfach durch die der indirekten Blatthälftenmethode anhaftenden Fehler erklärbar zu sein. Unter diesen Versuchsfehlern ist wohl der folgende am schwersten zu bekämpfen: Die Auswanderung der Assimilate findet auch am Lichte ununterbrochen statt; dieselbe kann aber nur an anderen Blättern quantitativ geschätzt werden, die gleichzeitig mit den am Lichte exponierten total verdunkelt sind. Dieses Verfahren ist gewiß nicht sehr zuverlässig, um so mehr, als es unbekannt bleibt, ob die Belichtung für die Entleerung der Chloroplasten nicht von Belang ist. Die möglicherweise ungleiche physiologische Leistungsfähigkeit der beiden Blatthälften bildet ebenfalls eine schwer kontrollierbare Fehlerquelle. Außerdem könnte die Blattfläche während der Exposition nicht konstant bleiben.

Thoday[3]) hat die Blatthälftenmethode einer experimentellen kritischen Untersuchung unterzogen und verschiedene Verbesserungen eingeführt. Dieser Forscher kommt auf Grund seiner eingehenden Versuche zu dem Schluß, daß, ungeachtet der oben erwähnten Mängel, die Größe der *Sachs*schen Ausbeuten nicht übertrieben ist. Die nach

1) *E. Giltay*, Ann. du jardin bot. de Buitenzorg **15**, 43, 1898.
2) *Boysen-Jensen*, Bot. Tidsskr. (Kopenhagen) **36**, 219, 1918.
3) *O. Thoday*, Proc. of the Roy. Soc. (B) **82**, 1, 421, 1909.

der Methode von *Thoday* ausgeführten Versuche von *Kostytschew* und seinen Mitarbeitern[1]) lieferten Resultate, die mit denjenigen *Thodays* übereinstimmen.

Die *Sachs*schen Resultate wurden übrigens auch durch die älteren nach der Blatthälftenmethode ausgeführten Untersuchungen von *A. Müller*[2]) bestätigt. In Anbetracht der so eindeutigen Ergebnisse, die von verschiedenen Forschern mit verschiedenen Pflanzen erhalten worden sind, taucht die Frage auf, ob die Methode der Luftdurchleitung, die an und für sich frei von unkontrollierbaren Fehlerquellen ist, immer unter Einhaltung aller notwendigen Vorsichtsmaßregeln verwendet wurde. Dies war in der Tat nicht der Fall.

Die ersten Versuche im Lufstrom hat der große Agrikulturchemiker *Boussingault*[3]) im Sommer 1840 ausgeführt. Er hat eine Weinrebe mit 20 Blättern in einen Glasballon von 15 Liter Inhalt eingeschlossen und durch den Ballon einen Luftstrom geleitet. Die Geschwindigkeit des Luftstromes betrug 15 Liter in einer Stunde. Das Kohlendioxyd wurde in einer Reihe von Absorptionsgefäßen aufgefangen, und zwar gleichzeitig auch in einem anderen Luftstrom von derselben Geschwindigkeit, der den Ballon nicht passierte. Dieser Versuch, der als Vorbild für alle nachfolgenden diente, war eigentlich ein qualitativer: es handelte sich darum, die Frage zu beantworten, ob die Pflanze imstande ist, den spärlichen CO_2-Vorrat der atmosphärischen Luft auszunutzen. Es ergab sich tatsächlich, daß die Luft nach Durchstreichen des Pflanzenbehälters bedeutend CO_2-ärmer wird.

Diese Methode wurde alsdann von *Kreusler*[4]) übernommen, der sie aber zu quantitativen Bestimmungen verwendete. Zu diesem Zwecke hielt es *Kreusler* für notwendig, die Geschwindigkeit des Luftstromes auf 60 Liter zu steigern, „... denn es läßt sich mit gutem Grund einwenden, daß eine Luftzufuhr von nur 15 Liter mit rund 6 ccm oder 12 mg Kohlendioxyd pro Stunde weder dem normalen Bedarf jener Pflanze, noch der normalen Versorgung, wie sie in freier Luft vor sich geht, einigermaßen entspricht." Leider hat *Kreusler* keine Kontrollprüfungen darüber angestellt, ob auch eine Luftstromgeschwindigkeit von 60 Litern in einer Stunde für seine Versuchsverhältnisse ausreichend war. *Brown* und *Escombe* (a. a. O.) haben bei ihren in analytischer Hinsicht mustergültigen Untersuchungen die Geschwindigkeit des Luftstromes bis auf 150 Liter pro Stunde gesteigert, verwendeten aber

[1]) *S. Kostytschew, M. Kudriavzewa, W. Moissejewa* und *M. Smirnova*, Planta **1**, 679, 1926.

[2]) *A. Müller*, Jahrb. f. wiss. Bot. **40**, 443, 1904.

[3]) *J. B. Boussingault*, Économie rurale **1**, 1841.

[4]) *U. Kreusler*, Landw. Jahrb. **14**, 913, 1885; **16**, 711, 1887.

hierbei auch sehr große Blattflächen. Es ist einleuchtend, daß bei so bedeutenden Luftstromgeschwindigkeiten die allgemein gebräuchlichen Absorptionsmethoden versagen und besondere CO_2-absorbierende Apparaturen ersonnen werden mußten. In den Versuchen *Giltays* (a. a. O.) erreichte die Geschwindigkeit des Luftstromes 25 bis 40 Liter in einer Stunde.

Es ist freilich verwunderlich, daß alle Forscher ihre Versuchspflanzen bloß durch Herstellung einer sehr großen Geschwindigkeit des Luftstromes vor CO_2-Mangel zu sichern suchten, ohne die assimilierende Blattfläche in Betracht zu ziehen. Es bedarf aber keiner besonderen Erläuterung, daß die jeweilige CO_2-Konzentration im Blattbehälter nicht nur von der Geschwindigkeit des Luftstromes, sondern auch von der Größe der assimilierenden Blattfläche und vom relativen Volumen des Behälters abhängt. Die Bedeutung der Blattfläche hat erst *Boysen-Jensen* (a. a. O.) hervorgehoben; er wies darauf hin, daß die erheblichen Schwierigkeiten der CO_2-Absorption im Luftstrom von einer ungemein großen Geschwindigkeit dadurch zu umgehen sind, daß man die großen Blattflächen von *Brown* und *Escombe* durch mehrmals geringere ersetzt. In diesem Falle erhält man unter Verwendung entsprechend geringerer Luftstromgeschwindigkeiten dasselbe Verhältnis der Luftmenge zur Blattfläche, das in Versuchen von *Brown* und *Escombe* bestand. Die absoluten CO_2-Mengen sind zwar bei Anwendung kleiner Blattflächen unbedeutend, man kann jedoch der hiermit verbundenen Fehlerquelle durch Verfeinerung der analytischen Bestimmung vorbeugen. Dies ist ganz richtig, allein es kommt gerade darauf an, die Frage zu lösen, ob das Verhältnis der Luftmenge zur Blattfläche auch in den Versuchen von *Brown* und *Escombe* ein derartiges war, daß die Versuchspflanze nicht an CO_2-Mangel litt.

Bei unseren eigenen Untersuchungen verwendeten wir ein Absorptionsgefäß, das eine von uns (*Bazyrina*) nach dem Prinzip desjenigen von *Brown* und *Escombe* konstruiert hat. Das *Bazyrina*sche Gefäß besteht aber lediglich aus Glas und wird nicht mit Natronlauge, sondern mit Barytlösung gefüllt, wodurch die CO_2-Bestimmungen bedeutend vereinfacht werden. Die ausführliche Beschreibung des Gefäßes wird an anderer Stelle erfolgen; hier beschränken wir uns auf folgende Hinweise: Bei einer Luftstromgeschwindigkeit von 20 bis 25 Liter pro Stunde wird die Gesamtmenge von Kohlendioxyd durch eine n/40 bis n/50 Barytlösung restlos absorbiert und es genügen also zur Titration die auf 0,01 ccm kalibrierten Büretten. Bei größeren Geschwindigkeiten des Luftstromes ist es ratsam, entweder konzentriertere Barytlösungen zu verwenden oder zwei Gefäße nacheinander einzuschalten. Die Versuche mit sehr geringen CO_2-Mengen erfordern selbstverständlich die Einhaltung spezieller Vorsichtsmaßregeln bei

der Entleerung des Absorptionsgefäßes und der Titration; auf diese Einzelheiten wollen wir aber nicht eingehen, da dieselben von verschiedenen Forschern besprochen worden sind. Es sei auch nur beiläufig bemerkt, daß unsere zahlreichen, mit Hilfe des obigen Absorptionsgefäßes ausgeführten Analysen der atmosphärischen Luft die folgende Behauptung *Lundegårdhs*[1]) bestätigen: Der CO_2-Gehalt der Luft ist so bedeutenden Schwankungen unterworfen, daß von einem „CO_2-Vorrat" der Atmosphäre kaum die Rede sein kann; es existiert vielmehr bloß ein dynamisches Gleichgewicht zwischen CO_2-Produktion und CO_2-Absorption.

Was nun speziell die Frage der photosynthetischen Ausbeute anbelangt, so haben wir zum ersten Male die methodische Seite der Luftdurchleitung allseitig geprüft, d. i. die Geschwindigkeit des Luftstromes ermittelt, bei welcher eine bestimmte Blattfläche unter bestimmten Verhältnissen mit voller Intensität arbeitet. Dies kann man auf folgende Weise feststellen: Bleibt die Assimilationsintensität bei den beiden ungleichen Luftstromgeschwindigkeiten v_1 und v_2 konstant, so ist die geringere Geschwindigkeit v_1 unter den gegebenen Bedingungen eine ausreichende; ist dagegen die Ausbeute bei v_2 größer als bei v_1, so muß eine noch größere Geschwindigkeit v_3 geprüft werden usw., bis man eine konstante Ausbeute erhält.

Wir glauben auf die Wiedergabe dieser peinlichen Kontrollprüfungen verzichten zu dürfen und teilen nur das folgende endgültige Resultat mit: Die normale Assimilationsintensität der meisten von der Pflanze nicht abgetrennten Blätter wird nur durch einen Luftstrom gesichert, dessen Geschwindigkeit mindestens 1 Liter in einer Stunde auf je 1 qcm der Blattfläche beträgt. In einigen Fällen erwies sich eine noch größere Luftstromgeschwindigkeit als notwendig; infolgedessen benutzen wir meistens einen Luftstrom von mindestens 1,5 Liter pro Stunde und 1 qcm Blattfläche. Hierbei ist noch zu beachten, daß obiges Verhältnis nur bei Verwendung möglichst kleiner Blattbehälter besteht. Wir verwenden als Versuchsgefäße kleine Glaskammern und Glasröhren, die der Form der Blätter angepaßt sind und deren Volumen in Kubikzentimetern die Zahl der Quadratzentimeter der Blattfläche nicht übersteigt. Wir arbeiten immer im Freien mit einzelnen, von der Mutterpflanze nicht abgetrennten Blättern, die in der Mündung der Kammer locker befestigt sind. Die Kammer kommuniziert unmittelbar mit dem Absorptionsgefäß, nach welchem noch eine kleine Kontrollflasche mit Barytwasser eingeschaltet wird. In kurzdauernden Versuchen ist es nach unseren Erfahrungen ratsam, auf Luftpumpen und Gasuhren zu verzichten und einen Luftstrom von erwünschter

---

[1]) *H. Lundegårdh*, Der Kreislauf der Kohlensäure in der Natur. 1924.

Geschwindigkeit durch Herausfließen des Wassers aus großen, kalibrierten, pipetteähnlichen Gefäßen herzustellen. Diese Gefäße können leidlich durch geräumige kalibrierte Glasflaschen mit Ausflußrohr ersetzt werden. Gleichzeitig wird ein Luftstrom von genau derselben Geschwindigkeit durch ein anderes Absorptionsgefäß geleitet, ohne mit dem Blatte in Berührung zu kommen. Die Differenz der beiden CO_2-Bestimmungen ergibt die photosynthetische Ausbeute des Blattes.

Untersucht man die einschlägige Literatur, so vergewissert man sich leicht davon, daß obiges Verhältnis zwischen Blattfläche und Geschwindigkeit des Gasstromes nie eingehalten wurde. Außerdem hat man immer übermäßig große Pflanzenbehälter verwendet. Man glaubte schließen zu dürfen, daß ein Laubblatt nicht an CO_2-Mangel leidet, wenn es nicht die Gesamtmenge von Kohlendioxyd aus der durchstreichenden Luft absorbiert. Diese Annahme ist aber durchaus irrig; macht der CO_2-Gehalt der aus dem Blattrezipient heraustretenden Luft etwa die Hälfte des normalen CO_2-Gehalts aus, so sinkt bereits die Intensität der Photosynthese auffallend stark. In ihrer ersten Arbeit haben *Brown* und *Escombe*[1]) dargetan, daß bei Steigerung des CO_2-Gehalts die Ausbeute innerhalb eines bestimmten Intervalls im linearen Verhältnis zum jeweiligen CO_2-Gehalt bleibt. Diese Regel gilt jedoch nur für CO_2-Konzentrationen, welche die normale CO_2-Konzentration in der atmosphärischen Luft übersteigen. Unterhalb des normalen CO_2-Gehalts sinkt die Photosynthese in einem schnelleren Tempo. Überblickt man die Versuchstabellen sämtlicher Forscher, welche die photosynthetische Ausbeute im Strome der atmosphärischen Luft ermittelten, so ersieht man sofort, daß in den meisten Fällen eine größere Ausbeute in denjenigen Versuchen zu verzeichnen ist, in welchen das Verhältnis der durchgelassenen Luftmenge zur Blattfläche ebenfalls größer ist als in anderen durchschnittlichen Versuchen. Eine normale Ausbeute wurde aber in Versuchen im Luftstrom noch nie erreicht.

In den nachstehenden Tabellen haben wir die maximalen Ausbeuten einiger unserer Versuche im Luftstrom von einer ausreichenden Geschwindigkeit zusammengestellt. Alle diese Versuche lieferten vollkommen eindeutige Resultate: Im Luftstrom, also durch direkte CO_2-Bestimmungen erhält man dieselben enorm großen Ausbeuten, welche die Blatthälftenmethode ergibt. Die Geschwindigkeit des Luftstromes war in allen nachstehenden Versuchen gleich entweder 20 oder 12 Liter pro Stunde, und ein jeder Versuch dauerte 30 Minuten. Als Absorptionsflüssigkeit diente n/40 Barytlösung. 1 ccm dieser Lösung entspricht etwa 0,75 mg CO_2. Es konnten daher Hunderstel eines Milligramms sicher ermittelt werden.

[1]) *H. T. Brown* and *F. Escombe*, Proc. of the Roy. Soc. **70**, **397**, **1902**.

Alchemilla sp. Blattfläche 5,2 qcm.

In 30 Minuten 10 Liter Luft durchgelassen.

Temperatur	Kohlendioxyd		CO_2-Ausbeute	Ausbeute auf 1 qm Blattfläche	
	Kontrolle	Versuch		CO_2	Zucker
°C	mg	mg	mg	g	g
16	5,95	4,95	1,00	3,85	2,62
17,5—18	5,76	5,02	0,74	2,85	1,94
19—20	5,84	5,02	0,82	3,15	2,15
22—19	6,03	5,22	0,81	3,11	2,12
15—14	6,09	5,62	0,47	1,80	1,23
14	5,96	5,29	0,67	2,58	1,76

Alchemilla sp. Blattfläche 4,95 qcm.

In 30 Minuten 10 Liter Luft durchgelassen.

Temperatur	Kohlendioxyd		CO_2-Ausbeute	Ausbeute auf 1 qm Blattfläche	
	Kontrolle	Versuch		CO_2	Zucker
°C	mg	mg	mg	g	g
11	6,09	5,43	0,66	2,67	1,82
14—15	6,03	5,02	1,01	4,08	2,78
16—17	5,69	5,09	0,60	2,42	1,65
18—19	5,89	5,09	0,80	3,23	2,20

Plantago major. Blattfläche 5,3 qcm.

In 30 Minuten 10 Liter Luft durchgelassen.

Temperatur	Kohlendioxyd		CO_2-Ausbeute	Ausbeute auf 1 qm Blattfläche	
	Kontrolle	Versuch		CO_2	Zucker
°C	mg	mg	mg	g	g
11—12	6,29	5,62	0,67	2,57	1,75
15—16	5,68	5,08	0,60	2,26	1,54
16—17	5,76	5,29	0,47	1,77	1,21

Betula pubescens. Blattfläche 5,8 qcm.

In 30 Minuten 10 Liter Luft durchgelassen.

Temperatur	Kohlendioxyd		CO_2-Ausbeute	Ausbeute auf 1 qm Blattfläche	
	Kontrolle	Versuch		CO_2	Zucker
°C	mg	mg	mg	mg	g
14—15	5,81	5,37	0,44	1,52	1,04
20—21	5,56	4,98	0,58	2,00	1,36
22—23	5,81	5,22	0,59	2,03	1,38
19—17	6,14	5,49	0,65	2,24	1,53

Phleum pratense. Blattfläche 6 qcm (ausgeschnitten).
In 30 Minuten 6 Liter Luft durchgelassen.

Temperatur	Kohlendioxyd		CO_2-Ausbeute	Ausbeute auf 1 qm Blattfläche	
	Kontrolle	Versuch		CO_2	Zucker
°C	mg	mg	mg	g	g
20—22	3,02	2,34	0,68	2,27	1,55
17	3,36	2,81	0,55	1,84	1,25
19—20	3,09	2,68	0,41	1,37	0,93
20	3,09	2,27	0,82	2,73	1,86
20—22	2,81	2,13	0,68	2,27	1,55

Trifolium pratense. Blattfläche 6 qcm (ausgeschnitten).
In 30 Minuten 6 Liter Luft durchgelassen.

Temperatur	Kohlendioxyd		CO_2-Ausbeute	Ausbeute auf 1 qm Blattfläche	
	Kontrolle	Versuch		CO_2	Zucker
°C	mg	mg	mg	g	g
22	3,30	2,60	0,70	2,33	1,59
24	3,36	2,68	0,68	2,37	1,55
22	3,85	2,81	1,04	3,37	2,37
20	3,33	2,58	0,75	2,50	1,70
23	3,17	2,47	0,70	2,33	1,59

Wir sehen also, daß die bei Luftdurchleitung erhaltenen Ausbeuten denjenigen durchaus entsprechen, welche von *Sachs*, *Thoday*, *Müller* und *Kostytschew* mit seinen Mitarbeitern mit Hilfe der Blatthälftenmethode dargetan worden sind. Der Widerspruch zwischen den Resultaten der direkten Methode und der Blatthälftenmethode ist also aufgehellt und beseitigt. Es liegt uns ferne, zu behaupten, daß alle Resultate der früheren Untersuchungen im Luftstrome wegen CO_2-Mangels nicht zuverlässig seien; wir betonen nur den Umstand, daß die Intensität der Photosynthese *unter natürlichen Verhältnissen* auf Grund dieser Resultate nicht beurteilt werden kann.

Es ist ohne weiteres begreiflich, daß ein regelmäßiger Verlauf der Synthese organischer Stoffe mit der in unseren Versuchen ermittelten Geschwindigkeit solche Ernten zur Folge hätte, die tatsächlich nicht vorkommen und in Anbetracht der regulierenden Wirkung der Gestaltungskorrelationen auch kaum denkbar sind. Nun scheint es, daß der zeitliche Verlauf einer photochemischen Reaktion in der lebenden Zelle nicht reguliert werden kann; die physiologische Regulierung erfolgt also nur dadurch, daß die Photosynthese, je nach Bedarf, entweder gänzlich eingestellt oder mit voller Intensität in Gang gesetzt wird. Der Aufbau organischer Stoffe geht auf diese Weise nicht kontinuierlich vor sich; es werden vielmehr Ruhepausen eingeschaltet.

Diese Eigentümlichkeit des Tagesverlaufs der Photosynthese wurde bereits von *Kostytschew* und seinen Mitarbeitern (a. a. O.) hervorgehoben. Auch die von verschiedenen Forschern wahrgenommene „Inaktivierung“ der Chloroplasten ist vielleicht, wenigstens zum Teil, auf dieselbe Ursache zurückzuführen. Auch andere Vorgänge könnten mit der übermäßig großen Ausbeute zusammenhängen. Diese Frage beabsichtigen wir experimentell weiter zu bearbeiten.

Zusammenfassung der wichtigsten Resultate.

1. Die Methodik der Untersuchungen über die Photosynthese im Strome der mit CO_2 nicht angereicherten atmosphärischen Luft litt immer an dem Übelstande, daß die Geschwindigkeit des Luftstromes im Verhältnis zur verwendeten Blattfläche und zum Volumen des Blattbehälters zu gering war. Hierdurch sind die Diskrepanzen zwischen den Ausbeuten im Luftstrom und den nach der Blatthälftenmethode erhaltenen Ausbeuten erklärlich.

2. Bei ausreichender Luftstromgeschwindigkeit erhält man durch direkte CO_2-Bestimmungen dieselben enorm großen Ausbeuten, welche die Blatthälftenmethode liefert.

Über die Stabilität der chemischen Zusammensetzung der Pflanzen.

Von

Nicolai N. Iwanoff.

(Aus dem biochemischen Laboratorium des Instituts für angewandte Botanik, Leningrad.)

(Eingegangen am 12. Januar 1927.)

Die Verwandtschaft der Pflanzen wird nicht nur nach morphologischen und systematischen, sondern auch nach physiologischen und chemischen Merkmalen festgestellt.

Im Jahre 1906 hatten *Magnus* und *Friedenthal*[1]) die serodiagnostische Methode zur Bestimmung der Verwandtschaft zwischen einzelnen Gruppen von Pilzen angewandt; sie konnten zeigen, daß Ascomyceten — Hefe und Trüffeln — einander nahestehende Arten sind, während sich der Basidiomycetenpilz — Champignon — sowohl von Hefe als auch von Trüffeln unterscheidet. Diese Reaktion beruht auf der Identität oder großen Übereinstimmung der Eiweißstoffe der untersuchten Pflanzen. Die biologische Methode wird gegenwärtig von einigen Systematikern zur Bestimmung verwandtschaftlicher Beziehungen in denjenigen Fällen angewandt, in denen morphologische Merkmale undeutlich sind. *Metz*[2]) arbeitete diese Methode weiter aus und wandte sie zur Aufstellung eines neuen Schemas der Pflanzensystematik an. Es ist sehr bezeichnend, daß dort, wo bei der Feststellung der Verwandtschaft von Pflanzen die morphologischen Merkmale keine entscheidende Rolle spielen konnten, chemische Kennzeichen in den Vordergrund traten. Letztere zeigten sich konstanter als die morphologischen Merkmale. Im Verlauf der Evolution änderte sich die Form der Organismen, und zugleich fand auch ein Wechsel in ihrer chemischen Zusammensetzung statt. Aber nah verwandte Arten von Pflanzen und Organismen hängen nicht nur durch die Ähnlichkeit äußerer Merkmale zusammen, sondern in noch stärkerem Maße durch die der inneren, d. h. durch

[1]) *Magnus* und *Friedenthal*, Ber. Bot. Ges. **24**, **601**, **1906**. Zeitschr. Immun.-Forsch. I, 4, 505, 1910.
[2]) *Metz*, Botan. Arch. 1, 11, 1922.

chemische und physiologische Kennzeichen. Auf diesen Umstand hat schon *Rochleder*[1]) hingewiesen, der annahm, daß die gleiche chemische Natur von Pflanzenstoffen mit der Verwandtschaft der Pflanzen in Verbindung gebracht werden muß. Auf die Zuverlässigkeit chemischer Merkmale für gewisse Pflanzenarten weist auch *S. L. Iwanoff*[2]) hin, der Ölpflanzen untersuchte. Dieser Autor spricht von einer Konstanz der chemischen Zusammensetzung der Pflanzen und von Änderungen chemischer Prozesse, wodurch zwar die Beziehungen zwischen einzelnen Pflanzenstoffen gestört werden, qualitativ aber kein Wechsel eintritt.

Die Untersuchung der aus verschiedenen Ländern stammenden Kulturpflanzen ergibt ein reichhaltiges Material, aus dem hervorgeht, daß die Verbreitung von Pflanzen mit ein und denselben Nährstoffen immer an ein bestimmtes Klima gebunden ist.

Es ist bekannt, daß sich der Zuckergehalt in den Wurzeln der Zuckerrübe je nach den äußeren Wachstumsbedingungen, sehr stark ändert; die Zuckermenge nimmt beim Vorrücken von Süden nach Norden ab. Die chemische Zusammensetzung der Getreidepflanzen ändert sich gleichfalls je nach den klimatischen Einflüssen. Der Weizen wächst in nördlichen Gegenden sowie in Oasen der Sahara, aber die Schwankungen seines Eiweißstoffgehalts sind sehr groß; während für Schottland die Menge an Eiweißstoff im Korn 7,07 Proz. beträgt, ergaben die Analysen des Weizens im Kaukasus 24,4 Proz.. Alle diese Veränderungen besitzen jedoch keinen qualitativen, sondern einen quantitativen Charakter. Diesen Tatsachen ließe sich noch ein Hinweis auf den Wechsel bezüglich der Anhäufung von Alkaloiden, ätherischen Ölen und Pigmenten, je nach den äußeren klimatischen Bedingungen, zufügen. Derartige Untersuchungen sind von großer Bedeutung für praktische Zwecke, aber die hier erzielten Ergebnisse bieten auch vom allgemeinen biochemischen Standpunkt aus Interesse. Ein und dieselbe Pflanzenart (z. B. Weizen) weist in verschiedenen Gegenden eine differente chemische Zusammensetzung auf; früher wurde ein solcher Befund stets in dem Sinne erklärt, daß die Abweichung von der Rasseverschiedenheit der untersuchten Pflanzengattung herstamme.

Gegenwärtig werden zu vergleichenden Versuchen reine Linien von bestimmten Rassen (Sorten) von Pflanzen gesät und in Gegenden kultiviert, die sich durch ihr Klima voneinander stark unterscheiden. Solche „geographische Versuche" mit reinen Linien von zahlreichen Kulturpflanzen wurden im Verlauf von 4 Jahren im Institut für angewandte Botanik durch Prof. *N. I. Vavilov* ausgeführt. Wir hatten die Möglichkeit, dieses Material in biochemischer Hinsicht zu unter-

---

[1]) *Rochleder*, Phytochemie 1854.

[2]) *S. Iwanoff*, Bericht des Bureaus für Pflanzenbau, S. 3. Petrograd 1915 (russisch).

suchen. In dem ausgedehnten Gebiet der U. S. S. R. besitzt das Institut über 50 Punkte, die sich von 67° 44′ (Murmansk) bis 37° 35′ (Merw) nördlicher Breite und von 23° 51′ (Dotnawa, Litauen) bis 131° 87′ (Wladiwostok) östlicher Länge erstrecken. Das Klima dieser Punkte ist äußerst verschieden; bald See-, bald kontinentales, bald polares, bald subtropisches Klima. Infolge des unterschiedlichen Klimas und der gleichartigen Züchtungsbedingungen, sowie auch der Reinheit des Materials, erhielten wir in unserer Arbeit viele Daten über den Einfluß äußerer Faktoren auf die klimatische Pflanzenzusammensetzung.

Bei diesen Untersuchungen ergaben sich zwei Gruppen von Pflanzen: die eine änderte sprunghaft ihre chemische Zusammensetzung, die andere behielt sie unter jeglichen äußeren Verhältnissen unverändert bei. Die Hauptvorratsstoffe, denen wir unsere Aufmerksamkeit zuwandten, waren Eiweißstoffe und Kohlehydrate. In den Analysen der Samen ist der Prozentgehalt dieser Substanzen angegeben. Fanden wir z. B. in den Getreidesamen ein Ansteigen des Prozentgehalts von Eiweißstoffen, so ließ sich daraus der Schluß ziehen, daß die Körner nicht imstande waren, die nötige Menge Kohlehydrate anzuhäufen, wodurch das Gleichgewicht zwischen Kohlehydraten und Eiweißstoffen zugunsten der letzteren verschoben wurde. Wir führen den Eiweißstoffgehalt einer reinen Linie von Weizen an, der aus verschiedenen Punkten unseres Reiches im Jahre 1924 erhalten wurde.

Tabelle I.

Versuche mit Weizen (Triticum vulgare var. albidum.).

Punkte der Aussaat	Nördl. Breite	Östl. Länge	Prozentgehalt von Eiweißstoff im Weizenkorn (N × 5.7)
Semero-Dwinsk	60° 46′	46° 18′	11,92
Detskoje Selo	59 44	30 22	11,51
Gorki	54 13	30 38	11,11
Moskau	55 48	37 20	14,30
Kiew	50 27	30 28	19,32
Jekaterinoslaw	48 20	35 32	19,60
Saratow	51 37	45 45	21,01
Omsk	55 01	70 32	18,69
Krasnojarsk	56 01	92 52	19,03
Wladiwostok	43 05	131 57	11,86

Eine und dieselbe Weizensorte vermehrt schroff den Gehalt an Eiweißstoff beim Vordringen nach dem Süden und Osten, d. h. nach solchen Gegenden, welche sich in den meisten Fällen sowohl durch großen Stickstoffgehalt im Boden (Schwarzerde) als auch durch geringe Niederschlagsmengen (kontinentales Klima) auszeichnen, mit Ausnahme von Wladiwostok, das ein Seepunkt ist. Infolgedessen führt die erhöhte



Ernährung des Weizens mit Stickstoff zu einer gesteigerten Eiweißstoffanhäufung; die ungenügenden Niederschläge und das leicht eintrocknende Klima vermindern die Fähigkeit der Photosynthese in der Pflanze, so daß die Speicherung von Kohlehydraten im Korn geringer und somit die prozentuale Menge von Eiweißstoff größer wird[1]). Dieses Ergebnis erhält man stets, wenn die Pflanze vom Bodenstickstoff abhängig ist, dessen Menge überhaupt stark variiert, sowohl in ververschiedenen Böden als auch in einem und demselben in verschiedenen Perioden des Wachstums. Ein anderes Bild ergibt sich, wenn man von den Getreiden zu den Leguminosen übergeht, die bekanntlich unter normalen Wachstumsbedingungen vom Bodenstickstoff nicht abhängig sind, sondern sich auf Kosten desjenigen Stickstoffs ernähren, den sie von den in ihren Wurzeln lebenden Knöllchenbakterien erhalten. Hier war zu erwarten, daß das Verhältnis zwischen Stickstoff und Kohlenstoff nicht in gleicher Weise gestört wird wie bei den Getreidearten. Indessen steht fest, daß wir unter künstlichen Bedingungen, z. B. bei einer Kultur der Pflanze im Dunkeln, diese Beziehungen stören können. Da keine Photosynthese stattfindet, kann der Reserveeiweißstoff der Samen bei Mangel an Kohlehydraten nicht als Baumaterial dienen und wird daher in Asparagin umgewandelt. Umgekehrt, durch Züchten der Leguminosen am Lichte kann man aber nicht überschüssigen Stickstoff erhalten, denn die Menge des durch die Knöllchenbakterien fixierten Stickstoffs steht in direkter Beziehung zu denjenigen Kohlehydraten, die im Blatte synthetisiert und den Wurzeln zugeführt werden. Unlängst hat *Lewis T. Leonard*[2]) interessante Tatsachen über die Bildung von Knollen bei der Sojabohne mitgeteilt. Es ergab sich, daß jeglicher, eine Verminderung der Kohlehydrate bei Soja verursachende Einfluß, wie Verringerung der Lichtintensität, der Kohlensäuremenge und besonders das Abschneiden der Blätter, zur Abnahme, ja zum völligen Verschwinden der Knollen und somit auch der Fixierung des Stickstoffs führt. Die Abhängigkeit der Stickstoffnahrung von der Photosynthese ist schon früher festgestellt worden. *S. Kostytschew*[3]) hat seine Aufmerksamkeit darauf gerichtet, daß die Leguminosen, die fertigen Stickstoff erhalten, viel stärker die Kohlensäure zu assimilieren vermögen als alle anderen Pflanzen.

Die eigenartige Fähigkeit der Leguminosen, gebundenen Stickstoff auf Kosten der von ihnen verarbeiteten Kohlehydrate zu erhalten, zeigte sich auch in den weiter unten beschriebenen Versuchen. Wir

---

[1]) Feststellungen über die Veränderung des Weizens je nach den äußeren Einflüssen finden sich bereits in der agronomischen Literatur vor.

[2]) *L. T. Leonard*, Journ. of the Amer. Soc. of Agron. **18**, 1012, 1926.

[3]) *S. Kostytschew*, Ber. d. Deutsch. Bot. Ges. **40**, 112, 1922.

fanden gleiche Beziehungen zwischen den Eiweißstoffen und den Kohlehydraten in den Samen der Leguminosen, da sich eine ganz bestimmte Stabilität in der chemischen Zusammensetzung der Samen aufweisen ließ, die sich unter allen möglichen äußeren Entwicklungsbedingungen dieser Pflanzen erhielt.

Wir führen einige Beispiele an.

Versuche mit der Erbse.

Eine Erbsensorte, Pisum sativum v. vulg., war 1924 in verschiedenen Punkten ausgesät worden; das gesammelte Material wurde auf Stickstoff- und Eiweißstoffgehalt analysiert. Wie aus der folgenden Tabelle zu ersehen ist, hat sich der Gehalt an Stickstoff und Eiweißstoff fast gar nicht verändert, trotz der starken Unterschiede im Klima dieser Punkte.

Tabelle II.

Erbse (Pisum sativum v. vulgare). Ernte 1924.

Punkte der Aussaat	Bezirk	Nördliche Breite	Östliche Länge	Proz. auf Trockengewicht	
				Menge Stickstoff	Menge Eiweißstoff
Priladoga	Nordwestlich	59° 52′	31° 30′	4,24	26,50
Nowgorod	„	59 00	31 52	4,45	27,81
Dotnawa	Westl. Litauen	54 54	23 53	4,43	27,68
Minsk	Westen	53 54	27 33	4,59	28,37
Moskau	Zentrum	55 48	37 20	4,50	28,12
Poltawa	Ukraine	49 35	34 34	4,57	28,19
Kiew	„	50 27	30 28	4,62	28,87
Askania Nova . . .	Krim	46 25	33 50	4,51	28,19
Karajasi	Kaukasus	41 27	45 06	4,75	29,68
Saratow	Südosten	51 37	40 45	4,46	27,88
Omsk	Sibirien	55 01	70 32	4,50	28,12
Wladiwostok . . .	Ferner Osten	43 05	131 57	4,30	26,87
			Im Mittel:	4,49	28,02

Eine fast vollständige Übereinstimmung im Stickstoff- und Eiweißstoffgehalt besteht in den Punkten, die sich *um 16° Breite und um 100° Länge unterscheiden,* nämlich in Priladoga und Wladiwostok. Der mittlere Gehalt an Eiweißstoff in den ausgewählten Punkten variiert so wenig, daß man von einer Stabilität der chemischen Zusammensetzung der Erbse ohne weiteres sprechen kann. Auch ergibt sich die Einstellung eines Gleichgewichts der Stickstoff- und Kohlenstoffanhäufung in diesen Samen.

Die allgemeine summarische Analyse der Erbsensamen — Aschengehalt, mit Äther extrahierbare Substanzen und rohe Cellulose — ergibt die gleichen Zahlen für Samen, die in denselben durch Klima und Boden gänzlich verschiedenen Versuchspunkten aufgezogen sind.

Nachfolgend führen wir Analysen von fünf Punkten für eine andere Erbsensorte, Pisum sativum coronatum, an.

Tabelle III.

Erbse (Pisum sativum coronatum). Ernte 1924.

Punkte der Aussaat	Bezirk	Prozentgehalt auf Trockengewicht				
		Asche	Substanzen mit Äther extrahiert	Rohe Cellulose nach *König*	Stickstoff	Eiweißstoff
Priladoga . .	Nordwesten	2,95	1,35	3,02	4,50	28,12
Kiew	Ukraine	3,35	1,33	3,18	4,70	29,37
Askania Nova	Krim	3,09	1,29	2,75	4,50	28,12
Saratow . . .	Südosten	3,07	1,41	3,12	4,90	30,62
Wladiwostok .	Ferner Westen	3,12	1,24	2,65	4,40	27,66
	Im Mittel:	3,12	1,32	2,94	4,60	28,75

Wir berühren hier keine Fragen agronomischen Charakters, insbesondere nicht den Ernteertrag der Erbsensamen in den genannten Punkten, der natürlich sehr verschieden ist, aber wir lenken die Aufmerksamkeit darauf, daß man in allen Fällen Samen gleicher Zusammensetzung erhält. Was die Ernten der Erbse anbetrifft, so steigen dieselben bedeutend, wenn die Erbsensamen künstlich mit Knöllchenbakterien vor der Aussaat versehen werden[1]). Dieses bestätigt nochmals die Existenz einer direkten Beziehung zwischen der Kohlenstoff- und Stickstoffnahrung bei Leguminosen.

Diese Resultate wurden unter den Bedingungen des Feldversuchs erzielt, wobei die Stickstoffdiät des Bodens nicht in Betracht gezogen wurde. Überdies war bekannt, daß der Gehalt an Stickstoff und an Aschebestandteilen im Boden sehr verschieden war. In den Aussaatspunkten hatten wir es mit Schwarzerdeboden und solchem ohne Schwarzerde zu tun. Wenn wir nun bei solchen ganz ungleichen Verhältnissen eine identische chemische Zusammensetzung erzielt haben, so können wir annehmen, daß bei Leguminosen eine Stabilität der chemischen Zusammensetzung besteht.

Versuch mit der Linse.

Wir finden denselben Gehalt an Stickstoff und Eiweißstoff in Punkten, die *um 108° Länge differieren*, wie Dotnawa und Wladiwostok. Hieraus geht hervor, daß die Linse, ebenso wie die Erbse, eine konstante chemische Zusammensetzung aufweist. Wir haben Analysen der Linse bezüglich des Gehalts an Asche, roher Cellulose nach *König* und in Äther löslichen Substanzen ausgeführt und haben gefunden, daß sowohl

---

[1]) *A. L. Whiting, E. B. Fred* and *J. W. Steens*, Agr. Exp. St. of Wisconsin 1925. Bull. 372.



Tabelle IV.

Linse (Ervum Lens v. nigra). Ernte 1925.

Punkte der Aussaat	Bezirk	Nördliche Breite	Östliche Länge	Proz. auf Trockengewicht	
				Menge Stickstoff	Menge Eiweißstoff
Priladoga	Nordwesten	59° 52′	31° 30′	5,00	31,25
Nowgorod . . .	„	59 00	31 52	5,09	31,81
Dotnawa	West-Litauen	54 54	23 53	4,79	29.93
Gorki	Westen	54 13	30 38	5,14	32,12
Moskau	Zentrum	55 48	37 20	4,97	31,09
Poltawa	Ukraine	49 35	34 34	5,23	32,67
Charkow	„	50 00	36 14	5,12	32,03
Kiew	„	50 27	30 28	4,64	29,00
Bakuriani	Kaukasus	41 45	43 31	5,10	31,88
Taschkent	Turkestan	40 16	65 45	5,20	32,50
Saratow	Südosten	51 37	45 45	5,17	32,31
Omsk	Sibirien	55 01	70 32	4,78	29,87
Wladiwostok . . .	Ferner Westen	43 05	131 57	4,94	30,90
			Im Mittel:	5,01	31,31

der Stickstoff als auch diese Substanzen konstant erscheinen und vom Aussaatspunkt unabhängig sind. Beachtenswert ist ferner, daß sich die Linsenkörner, die von verschiedenen Punkten erhalten wurden, hinsichtlich ihrer Größe voneinander unterscheiden; dennoch ändert sich ihre Zusammensetzung nicht, wie aus den unten angeführten Daten zu ersehen ist.

Dieselbe Linse, wie in der Tabelle IV.

Punkte der Aussaat	Samenzahl pro 1 g	Proz. Eiweißstoff auf Trockengewicht der Samen
Krasnojarsk	72	29,56
Dotnawa	47	29,93
Omsk	35	29,87

Das Gewicht der Körner vermindert sich um die Hälfte, aber die chemische Zusammensetzung bleibt dieselbe, während für Getreidearten (Weizen, Gerste, Hafer und andere) schon längst bekannt ist, daß kleine Körner, besonders unreife, stets mehr Stickstoff enthalten als reife. Dies beruht darauf, daß in den Samen die stärkste Speicherung von Kohlehydraten (Stärke) während der zweiten Periode des Reifens stattfindet; bei den Leguminosen dagegen erfolgt die Ablagerung von Eiweißstoffen und Kohlehydraten parallel. In einigen Fällen, wie z. B. bei der Wicke, wurde die gleiche chemische Zusammensetzung sowohl in denjenigen Punkten, wo die Samen ausreiften, als auch dort, wo sie unreif abgenommen wurden, beobachtet.

Wicke (Vicia sativa v. Typica Beck). Ernte 1925.

Punkte der Aussaat	Reifestufe	Proz. Eiweißstoff auf Trockengewicht
Kostroma	unreif	35,44
Nowgorod	"	35,81
Moskau	reif	37,37
Poltawa	"	37,50

Wir haben zahlreiche Samenanalysen anderer Leguminosen [Wicke, Pferdebohne (Vicia faba) und Türkische Bohne (Phaseolus vulgaris)] ausgeführt und fanden überall in den Samen eine konstante, chemische Zusammensetzung, mit Ausnahme der türkischen Bohne, die in einigen Punkten eine ganz unerwartete Abnahme des Eiweißstoffgehalts ergab. Dieser Befund findet seine Erklärung darin, daß die türkische Bohne eine Kulturpflanze der heißen Zonen ist; im Norden können nur wenige frühe Sorten derselben gedeihen.

Die mangelnde Anpassungsfähigkeit dieser Kultur an die Bedingungen vieler von uns ausgewählter Punkte ruft unseres Erachtens eine Störung der Beziehungen zwischen den Eiweißstoffen und Kohlehydraten hervor, die zuweilen bei der türkischen Bohne auftritt.

Die festgestellte Stabilität der chemischen Zusammensetzung bei den Leguminosen erklärt sich, wie bereits zuvor erwähnt, dadurch, daß diese Pflanzen des gebundenen Bodenstickstoffs nicht bedürfen.

In der Literatur liegen jedoch Hinweise vor, daß sich eine Getreideart, nämlich Mais, in hohem Grade von anderen Getreiden (z. B. Weizen, Gerste und Hafer) hinsichtlich des Bodenstickstoffs unterscheidet. Während sich die letztgenannten Arten bei Stickstoffdüngung des Bodens (besonders mit Nitraten) so verhalten, daß der Eiweißstoffgehalt in den Körnern zunimmt, ändert sich die Menge des Eiweißstoffs beim Mais in keiner Weise, worauf schon *Woods*[1]) hingewiesen hat. Einen derartigen Vergleich der chemischen Zusammensetzung des Maises hat *Miller*[2]) unternommen, indem er Treibhaus- und Feldversuche bei verschiedener Stickstoffdiät des Bodens ausführte. Der Autor erhielt in allen Fällen Maiskörner mit demselben Gehalt an Eiweißstoffen. Das Fehlen klimatischer Einflüsse auf die chemische Zusammensetzung des Maises hatte schon früher *Richardson*[3]) ermittelt, indem er Körner aus verschiedenen Gegenden der Nordamerikanischen Union untersuchte. In einer letzthin erschienenen Arbeit teilt *Tottingham*[4]) mit, daß es ihm bei ähnlichen Züchtungsbedingungen an zwei Stellen Nordamerikas — Ashland und Madison —, die um 250 Meilen Breite voneinander differerieren, gelungen ist, Maiskörner mit gleichem Eiweißstoffgehalt zu erzielen. Beim Vergleich der Maisblätter mit den Blättern der Zuckerrübe,

[1]) *Woods*, Conn. (Storrs) Agr. Exp. Sta. Report 1889, S. 127.

[2]) *Miller*, Mo. Agr. Exp. Sta. Res. Bull. 42, 1921.

[3]) *Richardson*, U. S. Dept. Agric. Chem. Div. Bull. 4, 64, 1884; *Hunt*, The cereals in America, New York 1910. *Burt*, Davy. Maize, London 1914.

[4]) *Tottingham*, Science **59**, 1516, 1924.

deren Zusammensetzung von äußeren Einflüssen sehr abhängig ist, fand *Tottingham* große Differenzen:

	Trockengewicht	Stickstoff Proz.	Proz. löslichen Stickstoffs zum Gesamtstickstoff
Maisblätter	27,8	2,0	19
Zuckerrübenblätter	11,3	5,1	77

Der Autor lenkt die Aufmerksamkeit auf die große Verschiedenheit der Blätter dieser Pflanzen. Er ist geneigt, in dem abweichenden chemischen Mechanismus dieser Pflanzen die Ursache für die chemische Stabilität beim Mais zu erblicken.

Versuche mit Mais.

Wir haben Analysen von fünf Maissorten ausgeführt, die in 31 Punkten unseres Reiches gezüchtet worden waren. Es ergab sich, daß die Maiskörner trotz der starken Unterschiede des Bodens und auch des Klimas unserer Punkte fast den gleichen Eiweißstoffgehalt aufwiesen.

Tabelle V.

Mais (Zea Mays, italienische Sorte; Vilmoren).

Punkte der Aussaat	Bezirk	Nördliche Breite	Östliche Länge	Eiweißstoffmenge Proz.
Dotnawa	Westl. Litauen	54° 54′	23° 53′	11,97
Jekaterinoslaw . .	Ukraine	48 20	35 32	13,68
Askania Nova . .	Krim	46 25	33 50	12,25
Jalta	„	44 30	34 11	14,02
Taschkent	Turkestan	40 16	65 45	11,90
Saratow	Südosten	51 37	45 45	11,91
Omsk	Sibirien	54 01	70 32	11,51
Wladiwostok . . .	Ferner Westen	43 05	131 57	11,45
			Im Mittel:	12,33

Die Abweichung der Punkte *um 15° Breite* (Omsk und Taschkent) *und 108° Länge* (Dotnawa und Wladiwostok) beeinflußte in keiner Weise die Menge der Eiweißstoffe im Maiskorn. Diese Feststellung des fast gleichen Prozentgehalts an Eiweißstoff spricht dafür, daß auch das Verhältnis der Kohlehydrate und Eiweißstoffe im Maiskorn konstant bleibt. Eine derartige Erscheinung ist begreiflich, wenn wir es mit den Samen von Leguminosen zu tun haben, die eine ständige Quelle von assimilierbarem Stickstoff mit sich führen, die sie je nach den vorhandenen Bedürfnissen ausnutzen. Ganz anders dagegen verhält es sich mit dem Mais, der keine Knöllchenbakterien besitzt.

Die jüngst erschienenen Arbeiten von *N. A. Bezssonoff*[1]) zeigen, daß man Mais ohne jegliche Zugabe von gebundenem Stickstoff kultivieren und zum Reifestadium bringen kann. Im Verlauf von 3 Jahren (1924 bis 1926) kultivierte der erwähnte Autor Mais unter sterilen Bedingungen auf Sand, dem alle erforderlichen Salze (Gemisch *Mazé*), aber keine Stickstoffverbindungen zugesetzt waren. Überdies wurde dem Sande noch eine gemischte Kultur in Wasser suspendierter Bakterien — Stickstoffixatoren — hinzugefügt. Es ergab sich, daß sich Mais nur auf Kosten desjenigen Stickstoffs entwickeln konnte, der von den Bodenbakterien gebunden worden war. Andererseits erhielten die Bakterien Kohlehydrate und organische Säuren nur aus den Wurzeln der Pflanze selbst, denn im Sande waren keine organischen Substanzen enthalten; in einem Gefäße wurden 585,0 mg gebundenen Stickstoffs erzielt.

Diese Beziehungen zwischen den grünen Pflanzen und den im Boden frei lebenden Bakterien, die Stickstoff binden, erinnern vollkommen an die Tatsachen, die uns über die Stickstoffdiät der Leguminosen bekannt sind. Diese wichtige Entdeckung auf dem Gebiet der Stickstoffernährung grüner Pflanzen gibt uns die Möglichkeit, viele Feststellungen aus der agronomischen Praxis zu erklären, wie z. B. die Kultur ein und derselben Pflanze während mehrerer Jahre ohne Stickstoffdüngung. Ferner existieren Hinweise dafür, daß man, wenn auf ein und demselben Felde die frühere Kultur aus Mais bestand, nachher Weizen mit viel höherem Eiweißstoffgehalt erhält. Diese Befunde muß man mit den neuen Erfolgen der *Bezssonoff*schen Versuche zusammenstellen.

Kehren wir nun zur Stabilität der chemischen Zusammensetzung der Maiskörner zurück, so müssen wir annehmen, daß die vorhandenen beständigen Beziehungen zwischen Kohlehydraten und Eiweißstoffen dieselbe Ursache haben wie bei den Leguminosen: Selbständigkeit, Unabhängigkeit oder unbedeutende Abhängigkeit der Pflanzen von der Ernährung des Bodens mit Stickstoff.

Selbstverständlich haben wir, wenn von der Ähnlichkeit der chemischen Zusammensetzung ein und derselben Pflanze die Rede war, die unter verschiedenen klimatischen und Bodenbedingungen aufgewachsen war, die Gesamtmenge von Eiweißstoffen und Kohlehydraten gemeint; natürlich können auch gewisse Abweichungen in der qualitativen Zusammensetzung dieser Pflanzen vorkommen. Wir wissen, daß sich bei vielen Pflanzen unter dem Einfluß äußerer Faktoren sowohl die Menge der Kohlehydrate und Eiweißstoffe (der größte Teil der Getreidearten, Zuckerrübe), Alkaloide (Mohn) als auch die der

---

[1]) *N. A. Bezssonoff*, Ernährung grüner Pflanzen mit aus der Luft durch Bakterien absorbiertem Stickstoff. Neue Ideen in der Biologie **11**, 1925 (russisch). *G. Truffaut* et *N. Bezssonoff*, C. r. de la Soc. Biol. **91**, 1024, 1925; La science du sol. Mars. 1925.



Pigmente ändert. Die Stabilität in der chemischen Zusammensetzung der Leguminosen und des Mais muß daher besonders hervorgehoben werden.

Zusammenfassung.

Bei Leguminosen (Erbse, Linse, Wicke), die unter den verschiedensten Bedingungen (Boden, Feuchtigkeit und Klima) gezüchtet sind, wird der Gehalt an Eiweißstoffen in den Körnchen nicht geändert.

Es besteht eine bestimmte Beziehung zwischen Kohlehydraten und Eiweißstoffen, die darauf beruht, daß die Leguminosen unabhängig vom Boden hinsichtlich der Stickstoffaufnahme erscheinen. Eine gleiche Stabilität der chemischen Zusammensetzung beobachtet man, im Gegensatz zu anderen Getreidearten, auch in den Maiskörnern, die nach den Angaben von *Bezssonoff* und *Truffaut* auf Kosten desjenigen Stickstoffs gedeihen können, der von den Bodenbakterien aus der Luft fixiert wird.

Über die Säurebildung bei den Pilzen.

Von

Wl. S. Butkewitsch.

(Aus dem Timirjazeff-Forschungsinstitut Moskau.)

(Eingegangen am 14. Januar 1927.)

Nachdem ich bei näherer Untersuchung der von mir in den Zuckerkulturen von *Aspergillus niger* nachgewiesenen „dritten" Säure festgestellt hatte, daß diese mit Gluconsäure identisch ist[1]), deren Bildung bei demselben Pilze vor einiger Zeit von *M. Molliard*[2]) entdeckt worden war[3]), ging ich zu Versuchen mit anderen Pilzen über, für welche ich schon früher die Beobachtung gemacht hatte, daß sie in den Kulturen auf Zucker auch die Säuren bilden, die leicht lösliche Calciumsalze liefern.

Zur Abscheidung der betreffenden Salze bediente ich mich desselben Verfahrens, das bei meinen Versuchen mit *Aspergillus niger* angewandt worden war. Dabei wurde die Fällung der Calciumsalze mit Alkohol in der von Pilzdecken und unlöslichem Rückstand abgetrennten Kulturflüssigkeit entweder unmittelbar oder nach gewisser vorläufiger Einengung durch Abdampfen im Vakuum vollzogen. Bei allen Versuchen wurden die Nährlösungen mit höherem Zuckergehalt und verhältnismäßigem Stickstoffmangel gebraucht. Nachdem sich hinreichend starke Pilzdecken gebildet hatten, setzte man den Kulturen gewisse Mengen durch Erhitzen sterilisierten Calciumcarbonats zu.

Bei den weiter unten beschriebenen Versuchen prüfte man *Citromyces glaber*, *Penicillium glaucum*, eine *Citromyces*-Art, die sich zufällig im Laboratorium auf 10proz. Citronensäurelösung entwickelt hatte, und *Mucor stolonifer* (*Rhizopus nigricans*).

Alle Pilze, mit Ausnahme von *Mucor stolonifer*, wurden bei Zimmertemperatur von etwa 20° gezüchtet.

---

1) *Wl. Butkewitsch*, diese Zeitschr. **136**, 224; **142**, 195, 1923; **154**, 177, 1924.

2) *M. Molliard*, C. r. **174**, 881, 1922; **178**, 41, 1924.

3) Die Bildung der Gluconsäure in den Zuckerkulturen von *Aspergillus niger* wurde auch von *K. Bernhauer* (diese Zeitschr. **153**, 517, 1924) und von *R. Falck* und *S. N. Kapur* (Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **57**, 920, 1924) bestätigt.

Versuchsreihe 1. Citromyces glaber.

Nährlösung:	Rohrzucker	20,00 Proz.
	NH_4NO_3	0,15 „
	Salze (mit $ZnSO_4$) . . .	0,10 „

Man stellte sechs Kulturen auf, die insgesamt 1000 ccm Nährlösung enthielten. Am dritten Tage nach der Impfung wurden den Kulturen je 12 g Calciumcarbonat zugesetzt. Bald darauf ließ sich eine Ablagerung von Calciumcitrat in den Kulturen beobachten. Am 14. Tage wurden die Kulturen im *Koch*schen Sterilisator erhitzt und die Flüssigkeit von den Niederschlägen und Pilzdecken abfiltriert. Die abfiltrierte Flüssigkeit, die mit dem Waschwasser zusammen etwa 1000 ccm betrug, wurde durch Abdampfen im Vacuum bis zum etwa halben Volumen eingeengt und ihr stufenweise beim Vermischen 3 bis 4 Volumen 95proz. Alkohols zugesetzt. Der sich dabei bildende voluminöse flockige Niederschlag fiel am Boden als halbfeste klebrige Masse aus, die sich nach einigem Stehen verhärtete und auf der Oberfläche mit weißen nadelförmigen Kristallen bedeckte. Nach 2 Tagen wurde die klare Flüssigkeit vom Niederschlag abgegossen und dieser in etwa 200 ccm heißen Wassers aufgelöst. Die vom ungelöst gebliebenen unbeträchtlichen Rückstand des Calciumcitrats (0,7 g) abfiltrierte Lösung wurde auf dem Wasserbad stark eingeengt, mit einer Spur gluconsauren Kalks geimpft und stehengelassen. Bald trat Kristallisation ein, wobei sich die dem Calciumgluconat eigentümlichen knolligen Aggregate bildeten, die aus kleinen Nadeln zusammengesetzt waren. Von Mutterlauge abgesaugt, mit Wasser und Alkohol gewaschen und im Exsikkator getrocknet, betrug die auf diesem Wege erhaltene Substanz 17,5 g.

Aus der Mutterlauge erhielt man durch Fällung mit Alkohol noch einen bräunlich gefärbten Niederschlag. Aus diesem wurden durch Auflösen in Wasser, Kochen mit Tierkohle und Versetzen des Filtrats mit Alkohol noch 5 g kristallinischer Substanz ausgeschieden, die mit erster Fraktion vereinigt wurden.

Die beiden Fraktionen machten also zusammen 22,5 g aus. Nach mehrmaligem Umkristallisieren aus Wasserlösung unter Alkoholzusatz erhielt man etwa 15 g Substanz, die sich nach Calciumgehalt und anderen Eigenschaften als Calciumsalz der d-Gluconsäure identifizieren ließ.

In Wasser gelöst, erwies die Substanz keine Reduktion mit *Fehling*scher Lösung, reduzierte aber stark ammoniakalische Silberlösung unter Spiegelbildung und gab die Bergsche Reaktion mit Eisenchlorid[1]).

CaO-Gehalt.

0,2110 g bei 100° getrockneter Substanz gaben 0,0268 g, d. h. 12,70 Proz. CaO.

Berechnet für:

$Ca(C_6H_{11}O_7)_2 . H_2O$	12,51 Proz.
$Ca(C_6H_{11}O_7)_2$	13,02 „ [2])

[1]) *Berg*, Bull. de l'assoc. des chimistes (3) 11, 882, 1894.

[2]) Der Gehalt des Ca-Gluconats an Kristallisationswasser läßt sich nicht als sicher festgestellt annehmen. Es ist möglich, daß das Salz nicht ein ganzes, sondern ein halbes Molekül Wasser enthält.

Phenylhydrazid der Gluconsäure wurde nach *E. Fischer* und *Passmore*[1]) dargestellt. Nach Umkristallisieren aus Wasser erhielt man eine in farblosen Prismen kristallisierte Substanz, die bei 199° schmolz und sich bei 200° unter Gasentwicklung zersetzte, was für Gluconsäurephenylhydrazid charakteristisch ist.

Cinchoninsalz. 2 g untersuchten Ca-Salzes wurden in etwa 100 ccm Wasser gelöst. Nachdem Calcium durch Fällung mit Oxalsäure entfernt worden war, setzte man dem Filtrat 2,7 g Cinchonin zu und erhitzte es mehrere Stunden auf dem Wasserbade, wobei das Cinchonin fast ganz aufgelöst wurde. Von geringem, ungelöst gebliebenem Rückstand abfiltriert, wurde die Lösung durch Abdampfen auf dem Wasserbad eingeengt und abgekühlt. Der bei einigem Stehen ausgeschiedene kristallinische Niederschlag wurde aus 95proz. Alkohol umkristallisiert. Die erhaltene Substanz (2,8 g) kristallisierte in sechseckigen Tafeln und schmolz bei 187°, d. h. verhielt sich wie das Cinchoninsalz der Gluconsäure[2]).

Das spezifische Drehungsvermögen. Eine 4 g Ca-Salz in 100 ccm enthaltende wässerige Lösung gab im 2,2-dm-Rohr bei 22° eine Winkelablenkung von + 0,69°. Daraus berechnet sich das spezifische Drehungsvermögen $[\alpha]_D^{22} = + 7{,}8^0$ [3]).

Die oben angeführten Ergebnisse stellen fest, daß die betreffende Substanz das Calciumsalz der d-Gluconsäure darstellte.

Aus dem von der Kulturflüssigkeit abgetrennten unlöslichen Rückstand wurde das Calciumsalz der Citronensäure nach dem üblichen Verfahren — durch Extrahieren dieses Rückstandes zusammen mit den Pilzdecken mit verdünnter Salzsäure, Einengen der Lösung durch Abdampfen und

---

[1]) *E. Fischer* und *Passmore*, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **22**, 2728, 1889.

[2]) Der Schmelzpunkt dieses Salzes liegt nach *E. Fischer* (Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **23**, 803, 1890) gegen 187°, nach *J. U. Nef* (Ann. d. Chem. u. Pharm. **403**, 204, 1914) gegen 189°.

[3]) Für das Ca-Salz der d-Gluconsäure fand *Bertrand* (C. r. **127**, 728, 1898) $[\alpha]_D^{20} = + 6^0\ 13'$ und *Nef* (Ann. d. Chem. u. Pharm. **357**, 214, 1907) + 10,5°. — Nach den in unserem Laboratorium von *W. W. Perwozwansky* ausgeführten Bestimmungen erwies sich $[\alpha]_D^{22}$ für das Ca-Salz der durch Oxydierung von Glucose mit Brom erhaltenen Gluconsäure gleich + 7,5°. Zur Drehungsbestimmung wurde die Lösung angewandt, die 5,07 g Ca-Gluconat in 100 ccm enthielt. Im 2,2-dm-Rohr gab diese Lösung bei 22° eine Winkelablenkung von + 0,84°. Für das von mir aus den Kulturen von *Aspergillus niger* abgeschiedene Ca-Gluconat wurde $[\alpha]_D^{22}$ auch gleich + 7,5° gefunden. Die Versuchslösung enthielt in diesem Falle 4,97 g Ca-Gluconat in 100 ccm und gab bei denselben Bedingungen eine Winkelablenkung von + 0,82°. Der in meiner vorigen Mitteilung (diese Zeitschr. **154**, 177, 1924) für dasselbe Salz angegebene Wert wurde unter den Bedingungen erhalten, die nicht gestatteten, die Bestimmung hinreichend genau auszuführen, und dieser Wert muß durch den hier oben angeführten ersetzt werden. *Falck* und *Kapur* (l. c.) und *Bernhauer* (l. c.) geben für das spezifische Drehungsvermögen des Ca-Gluconats von den *Aspergillus*-kulturen + 9,7 und 10,4° an, also die Werte, die sich dem bei *Nef* vorhandenen Werte nähern. Dieser scheint aber nicht genau zu sein.

Neutralisieren derselben mit Ammoniak — abgeschieden[1]). Auf diese Weise wurden 15,8 g einer bräunlich gefärbten Substanz erhalten. Von der Farbe wurde die Substanz durch wiederholte Fällung aus der Lösung in schwacher Salzsäure unter unvollständiger Neutralisation mit Ammoniak frei gemacht[2]). Das erhaltene Salz gab die der Citronensäure eigentümlichen Reaktionen, und sein Gehalt an Calcium entsprach dem des Ca-Citrats.

0,2430 g Substanz (bei 135 bis 140° getrocknet) gaben 0,0815 g, d. h. 33,54 Proz. CaO.

Berechnet für $Ca_3(C_6H_5O_7)_2$ 33,74 Proz. CaO.

Die Oxalsäure wurde in diesem Falle in den Kulturen von *Citromyces glaber* nicht nachgewiesen.

Außerdem wurde der Gehalt der Kulturflüssigkeit an Zucker nach *Bertrand* bestimmt. Die gefundene Menge betrug etwa 80 g. Daraus ergibt sich, daß etwa 120 g Zucker während der Pilzentwicklung verbraucht wurden. Die getrockneten Pilzdecken der Kulturen wogen insgesamt 14 g.

Zusammengefaßt lassen sich die Ergebnisse dieser Versuchsreihe auf folgende Weise zum Ausdruck bringen.

Zweiwöchige Kulturen von *Citromyces glaber* auf 1000 ccm Nährlösung, die 20 Proz., d. h. 200 g Rohrzucker enthielt.

Pilzdeckengewicht	14,0 g
Ca-Gluconat	22,7 g
Ca-Citrat	16,5 g
Verbrauchter Zucker	120,0 g

Versuchsreihe 2. Penicillium glaucum.

Nährlösung:	Rohrzucker	15,00 Proz.
	NH_4NO_3	0,15 „
	Salze (mit Zn)	0,10 „

In diesem Versuch wurde eine Kultur mit 150 ccm Nährlösung aufgestellt. Am vierten Tage nach der Impfung setzte man der Kultur 8 g Calciumcarbonat zu. Nach 3 Wochen wurde die Kultur im *Koch*schen Sterilisator erhitzt und die Flüssigkeit abfiltriert. Die Kulturflüssigkeit war etwas gelblich gefärbt und gab eine beträchtliche Reduktion mit *Fehling*scher Lösung.

Zur abfiltrierten Kulturflüssigkeit fügte man unmittelbar, ohne vorläufige Einengung, 2 bis 3 Volumen 95proz. Alkohols hinzu. Der flockige Niederschlag sammelte sich beim Stehen zu kompakter Masse am Boden. Nach einigen Tagen wurde die klare Flüssigkeit vom Niederschlag abgegossen, durch Destillation im Vakuum stark eingeengt und nach Zusatz von 3 Volumen Alkohols stehengelassen.

Der durch die erste Fällung mit Alkohol abgeschiedene Niederschlag wurde in heißem Wasser gelöst und die Lösung vom ungelöst gebliebenen

[1]) Vgl. *W. Butkewitsch*, diese Zeitschr. **131**, 327, 338, 1922; **136**, 224, 142, 195, 1923; **154**, 177, 1924.

[2]) Die braungefärbten Substanzen werden aus der Lösung nur nach vollständiger Neutralisation derselben niedergeschlagen. Ist diese unvollständig, so bleiben sie in Lösung.

Rückstand abfiltriert. Dieser Rückstand bestand aus mikroskopisch kleinen, oft in Sternen vereinigten prismatischen Nadeln, löste sich nicht in Wasser, aber leicht in Säuren, und seine Lösung in Schwefelsäure gab eine deutliche Reaktion von *Denigès*. Daraus ließ sich die Substanz als Calciumcitrat identifizieren.

Die vom Citrat abfiltrierte Lösung wurde durch Abdampfen etwas eingeengt und nach Alkoholzusatz stehengelassen. Der dabei abgeschiedene kristallinische Niederschlag wurde nach einigen Tagen auf der Nutsche abgesaugt, gewaschen und im Exsikkator getrocknet. Die auf diesem Wege erhaltene Substanz betrug 2,2 g und verhielt sich wie Calciumgluconat. Ihre wässerige Lösung zeigte aber noch eine deutliche Reaktion von *Denigès*. Von Citratbeimengungen ließ sich das Calciumgluconat durch fraktionierte Kristallisation aus wässeriger Lösung unter Stufenzusatz von Alkohol frei machen. In den letzten Fraktionen dieser Kristallisation fiel die Reaktion von *Denigès* negativ aus, und der Gehalt der abgeschiedenen Substanz an Calciumoxyd entsprach dem des Calciumgluconats.

0,1309 g Substanz gaben 0,0167 g bzw. 12,76 Proz. CaO.
Berechnet für $Ca(C_6H_{11}O_7)_2 . H_2O$ 12,51 Proz. CaO.

In der wiederholt mit Alkohol bearbeiteten Kulturflüssigkeit bildete sich allmählich beim Stehen ein weißer kristallinischer Niederschlag, der aus feinen Nadeln bestand. Von der Flüssigkeit abgetrennt, gewaschen und getrocknet, wog dieser Niederschlag etwa 0,2 g. Er gab die für Calciumgluconat charakteristischen Reaktionen und entsprach demselben auch nach dem Ca-Gehalt.

0,1212 g Substanz gaben 0,0152 g bzw. 12,54 Proz. CaO.

Außer Gluconsäure enthielt die untersuchte Kultur auch Citronensäure, die sich, wie man oben erwähnte, schon in der Kulturflüssigkeit neben Calciumgluconat nachweisen ließ. Eine gewisse Menge dieser Säure wurde auch aus dem von der Kulturflüssigkeit abgetrennten unlöslichen Rückstand nach dem üblichen Verfahren abgeschieden. Man extrahierte diesen Rückstand zusammen mit der Pilzdecke mit verdünnter Salzsäure und fällte die Citronensäure aus der durch Abdampfen eingeengten und mit Ammoniak neutralisierten Lösung als Calciumcitrat aus. Die auf diesem Wege erhaltene Substanz betrug etwa 0,35 g. Sie gab eine deutliche Reaktion von *Denigès* und enthielt neben Calciumcitrat bedeutende Mengen von Calciumphosphat. Der nach dem Verbrennen und Glühen verbliebene Rückstand machte etwa 39 Proz. aus[1]), und seine Lösung gab in Salpetersäure mit Molybdat eine starke Reaktion auf Phosphorsäure.

Oxalsäure wurde in dieser Kultur von *Penicillium glaucum* nicht nachgewiesen.

Die getrocknete Pilzdecke betrug 1,75 g.

Weiter unten folgt eine Zusammenstellung der oben angeführten Ergebnisse.

Dreiwöchige Kultur von *Penicillium glaucum* auf 150 ccm Nährlösung, die 15 Proz. bzw. 22,5 g Rohrzucker enthielt.

Pilzdeckengewicht	1,75 g
Ca-Gluconat	2,4 g
Ca-Citrat	0,5 g

Unverbrauchter Zucker war vorhanden.

---

[1]) Das Ca-Citrat, $Ca_3(C_6H_5O_7)_2$, enthält 33,74 Proz. CaO.

Daraus ergibt sich, daß der Gehalt der Kultur an den Säuren im gegebenen Falle unbeträchtlich war. Das läßt sich mit der bei *Penicillium glaucum* stark ausgesprochenen Fähigkeit, die organischen Säuren zu Kohlendioxyd zu verbrennen[1]), in Zusammenhang bringen.

Versuchsreihe 3.

Eine unbestimmte *Citromyces*art mit graugrünen Konidien.

Nährlösung:	Rohrzucker	15,00 Proz.
	NH_4NO_3	0,15 „
	Salze (mit Zn)	0,10 „

Für die Kultur wurden 150 ccm Nährlösung angewendet. Calciumcarbonat (8 g) wurde der Kultur am dritten Tage nach der Impfung zugesetzt.

Am 14. Tage wurde die Kulturflüssigkeit nach Abtötung der Kultur im *Koch*schen Sterilisator abfiltriert. Sie war bräunlich gefärbt und reduzierte die *Fehling*sche Lösung.

Zur abfiltrierten Flüssigkeit fügte man unmittelbar 2 bis 3 Volumen 95proz. Alkohols hinzu. Der dabei ausgefällte Niederschlag bildete beim Stehen einen festen, bräunlich gefärbten Kuchen, der auf der Oberfläche mit nadelförmigen, in Büscheln gesammelten Kristallen bedeckt wurde (Niederschlag I). Die Flüssigkeit wurde abgegossen und der Niederschlag in Wasser unter Erhitzen gelöst. Man filtrierte die Lösung vom ungelöst gebliebenen Rückstand ab, der aus Calciumcitrat bestand, und fällte die aufgelöste Substanz durch Alkoholzusatz wieder aus. Nach einigem Stehen bildete sich eine für Calciumgluconat charakteristische kristallinische Ausscheidung, die aus feinen, zu lockeren Sphäriten vereinigten Nadeln bestand. Von der Mutterlauge abgetrennt, gewaschen und getrocknet, betrug die abgeschiedene Substanz etwa 2,5 g.

Der vom ersten Niederschlag (I) abgegossenen Flüssigkeit setzte man noch etwas Alkohol zu. Nach einigem Stehen schied sich ein weißer kristallinischer Niederschlag ab, der sich ganz ähnlich der aus dem ersten Niederschlag durch Umkristallisieren erhaltenen Substanz verhielt. Der zweite Niederschlag, der etwa 0,3 g wog, wurde zur Bestimmung des Ca-Gehalts verwendet.

0,0865 g Substanz gaben 0,0104 g bzw. 12,64 Proz. CaO.
Berechnet für $Ca(C_6H_{11}O_7)_2 \cdot H_2O$ 12,51 Proz. CaO.

Aus dem unlöslichen Rückstand der Kultur wurde das Calciumcitrat nach dem üblichen Verfahren abgeschieden. Im erhaltenen Niederschlag ließen sich die für Calciumoxalat charakteristischen Würfel und Oktaeder neben den sternartig vereinigten prismatischen Nadeln von Calciumcitrat unter dem Mikroskop nachweisen. Von der Flüssigkeit getrennt und im Exsikkator getrocknet, wog der Niederschlag etwa 2 g. Mit schwacher Salzsäure bearbeitet, ging die abgeschiedene Substanz zum großen Teil leicht in Lösung über. Der ungelöst gebliebene Rückstand ließ sich nach dem mikroskopischen Aussehen und nach dem Verhalten gegen die Säuren als Calciumoxalat identifizieren.

---

[1]) *Wl. Butkewitsch*, diese Zeitschr. **129**, 464, 1922; **136**, 224, **1923**; vgl. auch *C. Wehmer*, Bot.-Ztg. **49**, 233, 1891.



Das aus der Salzsäurelösung durch Neutralisieren ausgeschiedene Calciumcitrat wurde nach den üblichen Reaktionen und nach dem Calciumgehalt identifiziert.

0,1080 g Substanz gaben 0,0363 g bzw. 33,61 Proz. CaO.
Berechnet für $Ca_3(C_6H_5O_7)_2$ 33,74 Proz. CaO.

Weiter unten folgt eine Zusammenstellung der Ergebnisse dieses Versuchs.

Zweiwöchige Kultur auf 150 ccm Nährlösung, die 15 Proz., d. h. 22,5 g Rohrzucker enthielt.

Pilzdeckengewicht	1,1 g
Ca-Gluconat	2,8 g
Ca-Citrat	2,0 g
Ca-Oxalat	ein wenig

Ein Teil des Zuckers blieb noch unverbraucht.

Versuchsreihe 4. Mucor stolonifer (Rhizopus nigricans).

Nährlösung:	Invertzucker	12,0 Proz.[1])
	$(NH_4)_2SO_4$	0,2 „ [2])
	Salze (mit Zn)	0,1 „

Bei diesem Versuch stellte man zwei Kulturen auf, die je 150 ccm Nährlösung enthielten. Nach der Impfung wurden die Kulturen im Thermostaten bei einer Temperatur von 30° untergebracht. Am vierten Tage setzte man den Kulturen je 8 g Calciumcarbonat zu. Nach einer Woche, nachdem sich starke Pilzdecken entwickelt hatten, ließ sich eine Gasausscheidung in der Kulturflüssigkeit auf der Oberfläche des Calciumcarbonats beobachten. In der dritten Woche zogen sich die Pilzdecken etwas zusammen und lösten sich von den Wänden des Kulturgefäßes ab.

Nach drei Wochen wurden die Kulturen im *Koch*schen Sterilisator erhitzt und die Kulturflüssigkeiten heiß abfiltriert. Die Pilzdecken und die Niederschläge wurden noch zweimal mit Wasser (je etwa 100 ccm) erhitzt, das abfiltrierte Waschwasser wurde durch Abdampfen eingeengt und zur Kulturflüssigkeit hinzugefügt.

Nachdem dieser Flüssigkeit etwa 3 Volumen 95proz. Alkohols zugesetzt worden waren, bildete sich ein fein zerteilter Niederschlag, der sich leicht zu Boden senkte. Unter dem Mikroskop erwies sich der Niederschlag aus sternartigen Nadelaggregaten und aus Sphäriten mit radialer Struktur zusammengesetzt. Der Niederschlag wurde auf der Nutsche abgesaugt, gewaschen, im Vakuumexsikkator getrocknet und gewogen. Er betrug 6,3 g.

Man löste die erhaltene Substanz wieder unter Erhitzen in Wasser auf, filtrierte die Lösung vom geringen, ungelöst gebliebenen

[1]) In diesem Versuche wurde Invertzucker statt Rohrzucker angewendet, da *Mucor stolonifer* keine Invertase bildet und den Rohrzucker gar nicht verbrauchen kann. Vgl. *Wl. Butkewitsch*, Jahrb. f. wiss. Bot. 38, 147, 1902.

[2]) Man ersetzte hier Ammoniumnitrat durch Sulfat, da *Mucor stolonifer*, nach den *Ritter*schen Beobachtungen, die Salpetersäure als Stickstoffquelle nicht verwerten kann. *G. Ritter*, Die Materialien zur Physiologie der Schimmelpilze. 1916 (russisch).

bräunlichen Rückstand ab, der aus Gips bestand, und engte das Filtrat durch Abdampfen auf dem Wasserbad ein. Schon beim Abdampfen entstand eine kristallinische Ausscheidung auf der Oberfläche der Flüssigkeit. Der nach Abkühlen und Stehen abgeschiedene kristallinische Niederschlag wurde auf der Nutsche abgesaugt und mit Wasser und Alkohol gewaschen. Nach einem kurzdauernden Trocknen im Exsikkator wog die erhaltene Substanz 4,5 g. Sie erwies sich nach dem Gehalt an Kristallisationswasser und an Calciumoxyd wie auch nach allen übrigen Eigenschaften mit dem Calciumsalz der Fumarsäure identisch.

Kristallisationswasser.

3,0505 g Substanz verlieren nach dem Trocknen bei 125° 0,7825 g bzw. 25,65 Proz. H_2O.

Berechnet für $(CH)_2(COO)_2Ca \cdot 3 H_2O$ 25,96 Proz. H_2O.

CaO-Gehalt des wasserfreien Salzes.

0,1290 g Substanz gaben 0,0470 g bzw. 36,43 Proz. CaO.
Berechnet für $(CH)_2(COO)_2Ca$ 36,36 Proz. CaO.

Aus dem Calciumsalz wurde leicht die freie Säure durch Entfernen des Calciums mit Oxalsäure und Einengen des Filtrats in Gestalt von blätterigen Kristallen erhalten. Die Säure löste sich schwer in Wasser und leicht in Alkohol und Äther.

Titrieren der Säure mit Phenolphthalein.

0,0582 g Substanz brauchten 10,2 ccm n/10 $Ba(OH)_2$.

Berechnet für dieselbe Menge von $(CH)_2(COOH)_2$ 10,3 ccm n/10 $Ba(OH)_2$.

Die Säure gab mit Ammoniak und Zink eine positive Reaktion auf Pyrrol, bildete mit Eisenchlorid einen bräunlich gefärbten Niederschlag und reduzierte leicht Kaliumpermanganat in der mit Schwefelsäure angesäuerten Wasserlösung schon in der Kälte. Die ammoniakalische Silberlösung wurde direkt durch die Säure selbst nicht reduziert, ihre Lösung erhielt aber diese Fähigkeit nach der Bearbeitung mit Permanganat in Gegenwart von Schwefelsäure[1]). Die untersuchte Substanz verhielt sich also wie Fumarsäure.

Aus der Mutterlauge der ersten Kristallisation des Calciumsalzes der Fumarsäure wurde durch Fällung mit Alkohol noch 1 g Substanz erhalten, die hauptsächlich aus demselben Salz bestand. Bei 100° 4 Stunden getrocknet, verliert die Substanz 13,97 Proz. Wasser, und nach solchem Trocknen enthielt sie 29,61 Proz. Calciumoxyd. Diese Werte entsprechen ziemlich nahe dem Calciumsalz der Fumarsäure, $(CH)_2(COO)_2Ca \cdot 3 H_2O$, wenn man annimmt, daß dieses Salz nur eine Hälfte seines Kristallisationswassers verlor[2]). In diesem Falle müßte man nach der Berechnung für

---

[1]) Unter Einwirkung von Permanganat auf Fumarsäure in saurer Lösung muß nach *Perdrix* Ameisensäure entstehen. *Perdrix*, Bull. de la soc. chim. (3) 23, 645, 1900.

[2]) Das Ca-Salz der Fumarsäure verliert verhältnismäßig leicht eine Hälfte seines Kristallisationswassers. Biochem. Handlex. 1, 2. Hälfte, S. 1144.



das Wasser und das Calciumoxyd entsprechend 13,33 und 30,77 Proz. bekommen. Aus diesem Salz ließ sich die freie Fumarsäure leicht nach demselben Verfahren wie früher ausscheiden.

Der von der Kulturflüssigkeit abgetrennte unlösliche Rückstand wurde der fraktionierten Auflösung in Salzsäure ausgesetzt. In den ersteren Fraktionen löste sich das Calciumcarbonat. Aus der letzteren sauren Fraktion wurde ein bräunlich gefärbter Niederschlag nach Abstumpfen der Säure mit Ammoniak abgeschieden. Unter dem Mikroskop ließ sich neben den braunen Flocken eine beträchtliche Menge von oktaedrischen Kristallen im Niederschlag nachweisen, die sich gegen die Säuren wie Calciumoxalat verhielten. Nach einer wiederholten Auflösung in Salzsäure und Fällung mit Ammoniak wurden etwa 0,15 g Calciumoxalat erhalten.

In der Kulturflüssigkeit fand man nach *Bertrand* 17,6 g unverbraucht gebliebenen Zuckers.

Die getrockneten Pilzdecken wogen 1,6 g.

Die Ergebnisse dieses Versuchs lassen sich auf folgende Weise zum Ausdruck bringen.

Dreiwöchige Kulturen von *Mucor stolonifer* auf 300 ccm Nährlösung, die 12 Proz., d. h. 36 g Invertzucker enthielt.

Pilzdeckengewicht	1,6 g
Ca-Fumarat	6,3 g (bzw. etwa 3 g Fumarsäure)
Ca-Oxalat	0,15 g
Verbrauchter Zucker . .	18,4 g

Die Ergebnisse der vorliegenden Versuche beweisen, daß die Gluconsäure ein weit verbreitetes Produkt der oxydativen Umwandlung des Zuckers durch die Pilze darstellt und daß ihre Bildung in diesem Vorgang ebenso üblich wie die der Citronen- und Oxalsäure ist. Die meisten untersuchten Aspergillaceen wiesen die Fähigkeit nach, diese drei Säuren zu bilden. Obwohl die Oxalsäure bei *Citromyces glaber* und *Penicillium glaucum* in den vorliegenden Versuchen nicht nachgewiesen wurde, zeigen doch die Ergebnisse der anderen Versuche mit denselben Pilzen[1]), daß auch diese imstande sind, die Oxalsäure zu bilden und unter gewissen Bedingungen in beträchtlicher Menge anzuhäufen.

Wie von *Wehmer*, *Molliard* und anderen Forschern und neuerdings besonders von *Bernhauer*[2]) festgestellt worden ist, kann die Anhäufung von Produkten der oxydativen Zuckerumwandlung bei einem und demselben Pilze, je nach der Kulturbedingung, sehr verschiedenartig zum Vorschein kommen. Wenn sich gewisse Substanzen in den Kulturen nicht nachweisen lassen, so ergibt sich daraus noch nicht, daß sie während des Stoffwechsels nicht gebildet werden, da die Anhäufung in der Kultur nicht nur von der Bildung, sondern auch von dem Verbrauch

---

[1]) *Wl. Butkewitsch*, diese Zeitschr. **129**, 455 und 464; **131**, 327 und 338, 1922; **136**, 224, 1923; *C. Wehmer*, Bot.-Ztg. **49**, 233, 1891; Chem.-Ztg. 1909, S. 1281.

[2]) *K. Bernhauer*, diese Zeitschr. **172**, 296, 313, 324, 1926.

abhängig ist. Eine Anhäufung des sich bildenden Produkts kann nur dann zustande kommen, wenn der Verbrauch der Bildung nachsteht. Wenn das nicht der Fall ist, so erfolgt keine Anhäufung. Daraus folgt, daß eine Erweiterung unserer Kenntnisse über die Natur der beim Stoffwechsel intermediär entstehenden Verbindungen, also auch über die Art der diesen Wechsel zusammensetzenden Vorgänge, durch die Versuche unter möglichst verschiedenartigen Kulturbedingungen erreicht werden kann. Dazu lassen sich auch die Versuche mit verschiedenen Organismen mit Erfolg benutzen.

In bezug auf ein und dasselbe Stoffwechselprodukt macht sich nicht selten eine sehr ungleiche Neigung zur Anhäufung bei verschiedenen Organismen geltend. So bildet z. B. die von mir als eine Zwischenstufe der Zuckerumwandlung bei *Aspergillus oryzae* nachgewiesene Ketoenolsäure[1]) eine Verbindung, die sich intermediär nach den zurzeit zu meiner Verfügung stehenden Ergebnissen auch bei anderen Pilzen bildet; die Neigung zur Anhäufung dieser Verbindung ist aber bei den letzteren viel schwächer als bei *Aspergillus oryzae* ausgeprägt[2]). Was die anderen Stoffwechselprodukte, wie z. B. Glucon-, Citronen-, Oxalsäure, anbelangt, so kann auch ihre Anhäufung bei verschiedenen Pilzen sehr verschieden zustande kommen.

Unter den Bedingungen unserer Versuche gelang es uns, bei *Mucor stolonifer* nur Fumar- und Oxalsäure nachzuweisen, d. h. die Säuren, deren Bildung bei diesem Pilze schon früher festgestellt war. Die Anhäufung der Oxalsäure unter gewissen Kulturbedingungen wies schon *Wehmer*[3]) bei *Mucor stolonifer* nach. Die Fumarsäure wurde bei demselben Pilz von *Ehrlich*[4]) aufgefunden[5]). Die Frage nach der Beziehung dieser Säure zum Zucker erfordert weitere Untersuchungen[6]).

---

[1]) *Wl. Butkewitsch*, Arch. f. wiss. Bot. 1, 657, 1926.

[2]) Diesem Gegenstand soll bald eine besondere Mitteilung gewidmet werden.

[3]) *C. Wehmer*, Bot.-Ztg. 49, 233, 1891.

[4]) *F. Ehrlich*, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 44, 3737, 1911. Später hat *Ehrlich* (ebendaselbst 52, 63, 1919) bei *Mucor stolonifer* neben Fumarsäure auch flüchtige Säuren, Bernsteinsäure, l-Äpfelsäure und d-Milchsäure nachgewiesen.

[5]) Später hat *Wehmer* eine *Aspergillus*art, *A. fumaricus*, beschrieben, die in den Zuckerkulturen neben unbeträchtlichen Mengen von Citronensäure reichlich Fumarsäure bildete, deren Ausbeute etwa 60 bis 70 Proz. des angewandten Zuckers betrug. *C. Wehmer*, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 51, 1663, 1918.

[6]) *Mucor stolonifer* bildet nach *Gottschalk* Fumarsäure auch auf Kosten von Brenztraubensäure (Zeitschr. f. physiol. Chem. 152, 136, 1926). Auf Glycerin, Äthylalkohol und Pepton als einzige Kohlenstoffquelle entsteht jedoch nach *Ehrlich* (l. c.) die Fumarsäure in den Kulturen von *Mucor stolonifer* gar nicht oder nur in Spuren. Die spurenweise Bildung von Fumarsäure auf Glycerin in einzelnen Versuchen erklärt *Ehrlich* dadurch, daß auch in solchen Lösungen stets glykogenhaltiges Pilzmycel entsteht, das Glucose in die Flüssigkeit entsendet.

Zusammenfassung.

Die Gluconsäure bildet bei den Aspergillaceen ein ebenso übliches Produkt der oxydativen Zuckerumwandlung wie Citronen- und Oxalsäure.

Unter relativem Stickstoffmangel und in Gegenwart von Calciumcarbonat läßt sich die Gluconsäure in den Pilzkulturen auf Zucker meistens in beträchtlicheren Mengen als die übrigen Säuren nachweisen.

Bei denselben Bedingungen ist es gelungen, in den Kulturen von *Mucor stolonifer* nur Fumar- und Oxalsäure nachzuweisen, d. h. die Säuren, die bei diesem Pilze auch von anderen Forschern gefunden worden waren.

Über die Elektrolytkoagulation der Kolloide.

IV. Mitteilung:

Elektrometrische und konduktometrische Titration von Mastixsolen.

Von

Adolph J. Rabinowitsch und Frl. **R. Burstein.**

(Aus dem Karpow-Institut für Chemie zu Moskau.)

(Eingegangen am 15. Januar 1927.)

Mit 5 Abbildungen im Text.

In anderen Abhandlungen[1]) dieser Reihe wurde der Koagulationsprozeß an Arsentrisulfidsolen mittels *konduktometrischer* Titration, an Ferrioxydsolen mittels *elektrometrischer* Titration verfolgt. Leider konnten auf keines dieser Objekte beide Methoden gleichzeitig angewendet werden, da das Arsentrisulfidsol die Platinelektrode vergiftet, was die elektrometrische Methode unanwendbar macht; Ferrioxydsole gehören nicht zu den „acidoiden" Solen, entwickeln während der Koagulation keine neuen Wasserstoffionen (oder nur in untergeordnetem Maße), was sie für die konduktometrische Titration ungeeignet macht.

Daher suchten wir ein Objekt acidoider Natur, welches die Anwendung der Platinelektrode gestattet. Ein solches schien uns in *Mastixsolen* vorzuliegen.

I.

Die Mastixsole wurden auf zweierlei Weise bereitet. *Kahlbaums* „Mastix gepulvert" wurde in 95- bis 96gräd. Äthylalkohol gelöst. Die erhaltene, etwa 5proz. Lösung wurde entweder in (bidestilliertes) Wasser eingegossen (5 : 100), oder, umgekehrt, es wurde Wasser dieser Lösung zugegeben. In beiden Fällen erhielten wir Mastixsole, die sich je nach der Bereitungsweise stark voneinander unterschieden. Bezeichnen wir Mastixsole, welche durch Eingießen von Wasser in Alkohollösungen von Mastix erhalten worden sind, als *a*-Mastixsole und die-

---

[1]) Erscheinen demnächst a. a. O.

jenigen, die umgekehrt durch Eingießen von Mastixlösung in Wasser hergestellt worden sind, als *b*-Mastixsole, so beobachten wir zwischen den beiden Arten Mastixsolen (nach der Filtration durch gewöhnliche analytische Papierfilter nicht zu kleinen Porendurchmessers) folgende Unterschiede:

1. Bei der Titration mit Kalilauge ergeben die *a*-Sole eine für acidoide Sole typische Leitfähigkeitstitrationskurve mit einem klar ausgeprägten Minimum (s. Abb. 1, Tabelle I). Die *b*-Mastixsole geben

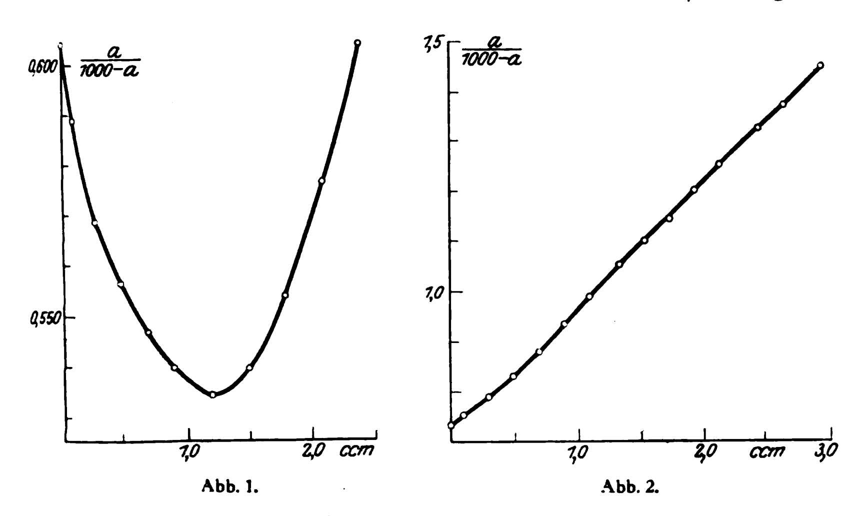


Abb. 1. Abb. 2.

eine kontinuierlich aufsteigende Kurve, ohne jegliches Minimum oder Wendepunkt, was der Leitfähigkeitstitration einer noch schwächeren Säure entspricht (s. Abb. 2).

Tabelle I.

Leitfähigkeitstitration von 40 ccm Mastixsol II (*a*) mit 0,005 n Kalilauge.
R = 3000 Ohm.

Temperatur °C	$a_{korr.}$	$a/1000 - a$	$a/1000 - a_{korr.}$ auf Verdünnung	Lauge ccm
22,4	376,5	0,6039	0,6039	0,00
22,4	370,5	0,5885	0,5886	0,10
22,4	360,6	0,5639	0,5687	0,30
22,4	354,8	0,5500	0,5564	0,50
22,4	349,6	0,5375	0,5468	0,70
22,4	345,3	0,5274	0,5397	0,90
22,4	341,6	0,5188	0,5344	1,20
22,4	342,0	0,5198	0,5397	1,50
22,4	346,3	0,5300	0,5540	1,80
22,4	357,8	0,5472	0,5765	2,10
22,4	363,4	0,5710	0,6039	2,40

Unser Sol I, welches ein Gemisch von *a*- und *b*-Mastixsol darstellte, ergab eine Leitfähigkeitstitrationskurve, die einen Übergang zwischen dem ersten und dem zweiten Typus darstellt (s. Abb. 3). Auf der Kurve sehen wir kein Minimum, sondern einen Wendepunkt.

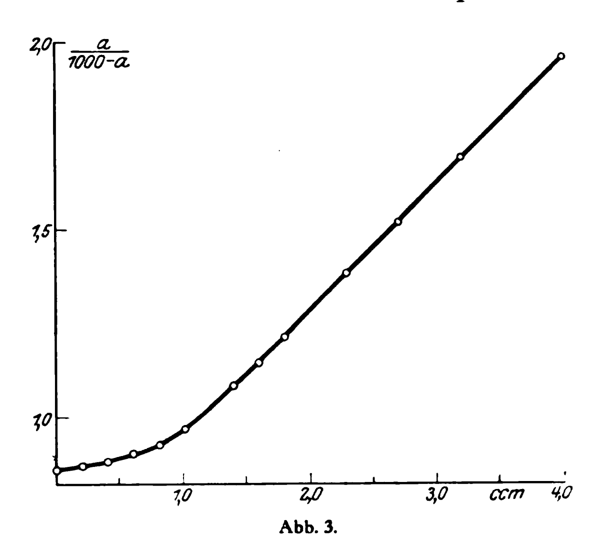


Abb. 3.

2. Führen wir die elektrometrische Titration der Mastixsole mit einer Pt-Wasserstoffelektrode oder einer Chinhydronelektrode durch, so erhalten wir die typische Titrationskurve einer mittelstarken Säure[1]) (s. Tabelle II, Abb. 4).

Tabelle II.

Elektrometrische Titration von 20 ccm Mastixsol II (a) mit 0,005 n Kalilauge mit Pt-Wasserstoffelektrode gegen gesättigte Kalomelelektrode. $t = 16,5^0$.

mV	p_H	Lauge ccm	mV	p_H	Lauge ccm
464,4	3,79	0,00	529,1	4,92	1,33
467,6	3,84	0,10	546,6	5,22	1,53
469,6	3,88	0,20	566,2	5,56	1,73
472,0	3,92	0,30	593,3	6,04	1,93
481,0	4,08	0,52	669,1	7,35	2,34
491,7	4,26	0,73	731,2	8,43	2,74
503,0	4,46	0,93	753,9	8,83	3,10
515,4	4,68	1,13			

[1]) Wie bekannt (*Tschirch* und *Reutter*, Arch. f. Pharm. **242**, 104, 1888), enthält Mastix eine Reihe mittelstarker einbasischer organischer Säuren: α- und β-Masticinsäuren, $C_{23}H_{36}O_4$; Mastikolsäure $C_{23}H_{36}O_4$; α- und β-Mastikonsäuren, $C_{32}H_{48}O_4$ u. a.

Der Endpunkt der Titration unserer Mastixsole mit Lauge in Gegenwart von Phenolphthalein als Indikator stimmt ziemlich gut mit dem der elektrometrischen Titration überein.

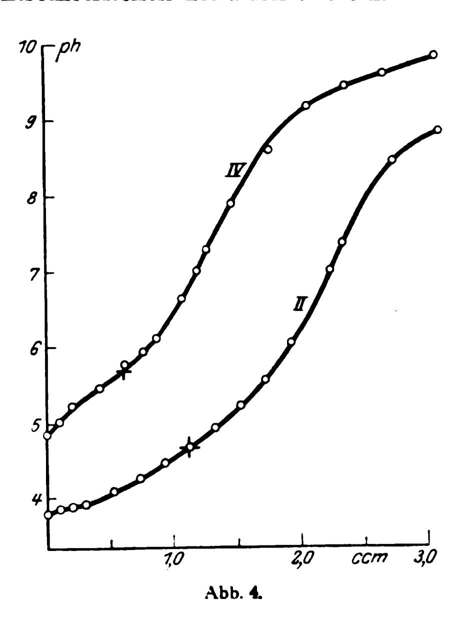


Abb. 4.

3. Der Wendepunkt der elektrometrischen Titrationskurve liegt für *a*-Mastixsole bei viel größeren Laugenmengen, als dem Minimum der Leitfähigkeitstitration entspricht. Dies ist leicht verständlich, wenn wir in Betracht ziehen, daß Mastix sich wie eine mittelstarke Säure benimmt, in welchem Falle, wie bekannt, das Leitfähigkeitsminimum keinesfalls mit dem Äquivalenzpunkt zusammenfällt; ersteres tritt bei kleineren Laugenmengen auf und kann zur Feststellung der Äquivalenz der Säure nicht dienen.

Für *b*-Mastixsole kann man einen solchen Vergleich nicht durchführen, da bei ihnen das Leitfähigkeitsminimum überhaupt fehlt.

4. Vergleichen wir die Wasserstoffionenkonzentrationen *h* der Mastixsole, die sich aus Leitfähigkeitsmessungen nach der bekannten Formel[1]) $h = \frac{1000\,\varkappa}{u_H + v_{col.}}$ ergeben, mit denjenigen, die sich aus der p_H-Messung im Sol berechnen lassen, so finden wir auch in dieser Beziehung einen großen Unterschied zwischen den *a*- und den *b*-Mastixsolen. In den ersteren stimmen die beiden Werte sehr genau überein, wie aus Tabelle III zu ersehen ist, in den letzteren bemerken wir dagegen

[1]) *Pauli* und *Semler*, Kolloid-Zeitschr. **34**, 145, 1924.

Tabelle III.

Sol-Nr.	Bereitungsweise	Konduktometr. Minimum (*M*) oder Wendepunkt (*W*). ccm Lauge (0,005 n) pro Liter Sol	Elektrometr. Wendepunkt. ccm Lauge (0,005 n) pro Liter Sol	h_x aus Leitfähigkeit	h_p aus elektrom. p_H-Messung	p_H des Sols
I	$a + b$ (Mischung)	*W* 23,7	—	—	$6,29 . 10^{-5}$	4,20
II	*a*-Sol	*M* 30,0	110	$1,45 . 10^{-4}$	$1,45 . 10^{-4}$	3,84
		30,0		$1,62 . 10^{-4}$	$1,62 . 10^{-4}$	3,79
					$1,74 . 10^{-4}$	3,76
III	*a*-Sol	*M* 18,7	80	(29. VII.) $9,55 . 10^{-5}$	$9,54 . 10^{-5}$	4,02
		21,2		(11. VIII.) $1,67 . 10^{-4}$	$1,69 . 10^{-4}$	3,77
IV	*b*-Sol	—	65	(4. VIII.) $1,66 . 10^{-4}$	$1,45 . 10^{-5}$	4,84
				(11. VIII.) —	$2,51 . 10^{-5}$	4,60

eine große Diskrepanz, die vielleicht darauf zurückzuführen ist, daß die Voraussetzungen, die der *Pauli*schen Formel zugrunde liegen, für die *b*-Sole nicht gelten.

Wie aus dieser Tabelle III ersichtlich, ändert sich das *h* der Mastixsole, nach beiden Methoden gemessen, allmählich mit der Zeit. Das ist wahrscheinlich mit einem langsamen Übergang von Mastixsäuren aus den Kolloidteilchen in wahre Lösung verbunden.

5. Die *b*-Mastixsole filtrieren durch gewöhnliche Papierfilter viel langsamer als die *a*-Sole. Härtere Papierfilter lassen ein fast durchsichtiges Ultrafiltrat passieren oder sind für die *b*-Mastixsole ganz undurchdringlich.

Stellen wir alle angeführten Eigenschaften der Mastixsole zusammen, so können wir daraus schließen, daß

a) die *b*-Sole schwächere Säuren sind als die *a*-Sole. Außer dem Unterschied in den konduktometrischen Titrationskurven folgt dies z. B. aus dem Vergleich der elektrometrischen Titrationskurven mit 0,005 n Kalilauge (s. Abb. 4, Tabelle II und IV) für das *a*-Mastixsol II (20 ccm, s. Tabelle II) und das *b*-Sol IV (40 ccm). Der Wert der Ordinate, die der halben Menge der zur Neutralisation benutzten Lauge entspricht, ist gleich dem negativen Logarithmus der Dissoziationskonstante der betreffenden Säure. Wir haben es mit einer Mischung nicht sehr verschiedener Säuren zu tun, die nicht elektrometrisch getrennt werden können. Deshalb können wir uns mit einer mittleren Dissoziationskonstante der Mischung begnügen. Bei dem *a*-Sol ist $K \simeq 2 . 10^{-5}$, bei dem *b*-Sol $K \simeq 2 . 10^{-6}$.

Um diesen Unterschied in den Säurestärken zu erklären, machen wir die Annahme, daß in der Wasser-Alkoholphase (Dispersionsmittel) der Mastixsole die schwächeren Säuren löslicher sind als die stärkeren, welche in den großen Micellen (s. weiter unten) der *b*-Sole bleiben und

auf dem Papierfilter zurückgehalten werden. Außerdem wird die aktuelle Acidität (h) der *a*-Sole dadurch erhöht, daß sie eine größere Menge Mastixsäuren in echter wasser-alkoholischer Lösung enthalten als die *b*-Sole. Dies ist leicht zu verstehen, wenn wir den zweiten Unterschied zwischen den beiden Arten Solen in Betracht ziehen, nämlich daß

b) die *a*-Sole viel kleinere Teilchen besitzen als die *b*-Sole. Dies folgt aus der viel leichteren Filtrierbarkeit der ersteren und wurde außerdem durch Vergleich der ultramikroskopischen Bilder beider Sole bestätigt. Sol X (*a*) und Sol XI (*b*), aus gleichen Mengen Mastix bereitet (die Mengen Wasser und Alkohol waren auch für die beiden Sole gleich), wurden im *Zeiss*schen Kardioidultramikroskop *vor der Filtration* miteinander verglichen. Sie zeigten einen auffallenden Unterschied, besonders wenn sie vorher stark verdünnt worden waren. Das zweite Sol enthält eine viel kleinere Anzahl Teilchen; ihre Größe (Helligkeit) ist nicht so regelmäßig wie im *a*-Sol; man findet unter ihnen einen großen Teil hellerer (gröberer) Teilchen. Ein quantitativer Vergleich wurde nicht ausgeführt, da der diffus beleuchtete Hintergrund auf die Anwesenheit unsichtbarer Amikronen hinweist.

Bestehen die *a*-Sole aus kleineren Teilchen als die *b*-Sole, so wird leicht verständlich, daß durch ihre größere Gesamtoberfläche die Überführung der Mastixsäuren in echte Lösung mit größerer Geschwindigkeit stattfinden kann. Daß ein solcher Prozeß sehr langsam vor sich geht, wird durch folgende Beobachtung wahrscheinlich gemacht. Sol IX, ein typisches *b*-Sol, erhielt nach dreimonatigem Stehen alle Eigenschaften der *a*-Sole: es gab ein scharf ausgeprägtes Minimum auf der Leitfähigkeitstitrationskurve, vollkommene Übereinstimmung von h_x mit h_p usw.

Bei der Filtration der *b*-Sole werden alle gröberen Mastixteilchen von dem Papierfilter zurückgehalten; die Analyse (durch Trocknen bei 105°) zweier Sole, die nach den beiden Methoden aus gleichen Stoffmengen hergestellt wurden, ergab für Sol X (*a*) bis 2,80 g pro Liter, für Sol XI (*b*) bis 1,95 g pro Liter. Mit den Teilchen wird auch ein Teil Wasserstoffionen, die die äußere Schicht der elektrischen Doppelschicht ausbilden, zurückgehalten (*Donnan*-Effekt). Es gelangt also in das filtrierte *b*-Sol eine kleinere Menge H^+-Ionen, was ihre niedrige h_p und die Abwesenheit des Minimums auf der Leitfähigkeitskurve erklärt.

II.

Führen wir die Elektrolytkoagulation der im vorigen Abschnitt mittels Laugentitration definierten Mastixsole durch, so finden wir, daß während der Koagulation keine Ansäuerung stattfindet.

Dies konnte an Mastixsolen nach zwei Methoden festgestellt werden.

Die konduktometrische (Leitfähigkeits-) Titration geschah in üblicher Weise, wie es in unserer zitierten Abhandlung an Arsentrisulfidsolen beschrieben ist. Als Beispiel möchten wir eine solche Titration des Mastixsols III mit $BaCl_2$ anführen (s. Tabelle IV und Abb. 5).

Tabelle IV.

Leitfähigkeitstitration des Koagulationsprozesses von Mastixsol III mit 0,01 n $BaCl_2$-Lösung. $R = 5000$ Ohm.

Temperatur °C	$a_{korr.}$	$a/1000 - a$	$a/1000 - a_{korr.}$ auf Verdünnung	Salzlösung ccm
20,8	425,5	0,7406	0,741	0
21,0	458,0	0,8450	0,850	0,2
21,2	484,4	0,9396	0,948	0,4
21,2	509,2	1,0375	1,052	0,6
21,2	531,3	1,1336	1,158	0,8
21,2	550,8	1,2267	1,258	1,0
21,2	568,4	1,3170	1,355	1,2
21,2	584,8	1,4084	1,457	1,4
21,2	599,5	1,4971	1,555	1,6
21,2	612,6	1,5810	1,650	1,8
21,2	626,2	1,6760	1,760	2,0
21,2	654,0	1,8900	2,006	2,5
21,2	677,9	2,1020	2,262	3,0
21,2	701,9	2,3530	2,560	3,5
21,2	715,2	2,5110	2,760	4.0

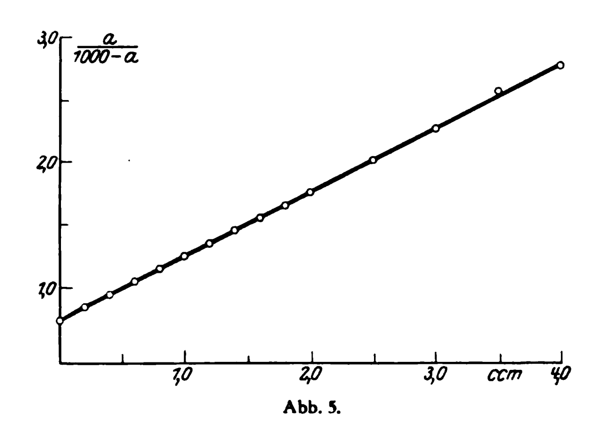


Abb. 5.

Wie aus Abb. 5 zu ersehen ist, stellt die entsprechende Kurve nahezu eine Gerade dar[1]). Dies zeigt, daß während des Koagulations-

[1]) Die an einigen dieser Kurven zu ersehenden kleinen Abweichungen von dem linearen Gange lassen sich auf die während der Koagulation stattfindende Änderung des Dispersitätsgrades, Temperaturschwankungen usw. zurückzuführen.



prozesses keine Wasserstoffionen frei werden. Dasselbe Resultat wurde auch bei der Leitfähigkeitstitration von verschiedenen Mastixsolen mit KCl, Na_2SO_4, $AlCl_3$, $La(NO_3)_3$, $Th(NO_3)_4$ erhalten.

Dies konnte auch mittels einer anderen Methode, nämlich der elektrometrischen Titration, bestätigt werden, was durch Tabelle V illustriert wird.

Tabelle V.

Elektrometrische Titration von 20 ccm Mastixsol II mit 0,01 n $BaCl_2$-Lösung mit Pt-H_2-Elektrode gegen gesättigte Kalomelelektrode. $t = 16{,}7^0$.

mV	p_H	Salzlösung ccm	*mV*	p_H	Salzlösung ccm
462,8	3,76	0,00	464,3	3,78	1,00
463,2	3,77	0,20	465,0	3,80	1,20
464,3	3,78	0,40	465,9	3,81	1,70
464,7	3,79	0,60	466,6	3,83	2,20
465,0	3,80	0,80	467,0	3,84	2,70

Daraus sehen wir, daß während des Koagulationsprozesses das p_H praktisch konstant bleibt, wenn wir die durch Verdünnung des ursprünglichen Mastixsols mit Salzlösung verursachte p_H-Erhöhung berücksichtigen[1]).

Dasselbe Resultat wurde auch schon von *Tartar* und *Draves*[2]) bei der Koagulation von Mastixsolen mit KCl gefunden. Dieses Salz gibt aber auch mit Arsentrisulfidsolen eine so schwache Ansäuerung, daß sie an Mastixsolen leicht übersehen werden kann. Es schien uns daher interessant, andere Salze in dieser Beziehung zu prüfen, die an As_2S_3-Solen eine starke Ansäuerung hervorrufen. Das Resultat aber fiel, wie gesagt, durchaus negativ aus.

Dies zeigt, daß Mastixsole viel schwächere Säuren darstellen als Arsentrisulfidsole. Bei den letzteren haben wir[3]) gezeigt, daß der Koagulationsprozeß immer unter Abgabe von freien Wasserstoffionen stattfindet. Dies haben wir so gedeutet, daß die eingeführten Kationen die anfangs in den Micellen eingebetteten (gebundenen oder nichtdissoziierten) Wasserstoffionen freisetzen. Bei den Mastixsolen ist dies

[1]) Führen wir die elektrometrische Titration mit Lösungen stark hydrolytisch gespalteter Salze aus; $Al(NO_3)_3$, $La(NO_3)_3$ usw., so erhalten wir selbstverständlich eine schwache Ansäuerung, die durch Einführen der H^+-Ionen mit der Salzlösung erklärt wird.

[2]) Journ. Phys. Chem. **30**, 763, 1926. Ihre Mastixsole waren nach einer unserer Methode *b* entsprechenden Weise bereitet.

[3]) *A. J. Rabinowitsch*, Zeitschr. f. physik. Chem. **116**, 97, 1925; *A. J. Rabinowitsch* und *W. A. Dorfmann*, l. c.

nicht der Fall. Diese Sole stellen so schwache Säuren dar, daß sie zur Salzbildung mit den betreffenden koagulierenden Kationen nicht fähig sind. Diese Kationen ersetzen nur diejenigen „freien" Wasserstoffionen, die an den Micellen adsorbiert sind und den äußeren Belag der Doppelschicht bilden. Weiter geht der Prozeß nicht.

Dies konnte auch durch einige analytische Adsorptionsmessungen während der Koagulation bestätigt werden. Als Beleg führen wir den folgenden Versuch an. 100 ccm Mastixsol II wurden mit 10 ccm 0,01 n $La(NO_3)_3$-Lösung, die 0,0094 g $La(NO)_3$ enthielt, koaguliert. Die Gewichtsanalyse des Filtrats nach der Koagulation ergab 0,0074 g $La(NO_3)_3$. Es wurden $1{,}85 \cdot 10^{-4}$ g-Äquivalent La [den aus der Lösung verschwundenen $0{,}0094 - 0{,}0074 = 0{,}0020$ g $La(NO_3)_3$ entsprechend] von dem Koagulat mitgerissen. Sol II enthielt (s. Tabelle III) $1{,}7 \cdot 10^{-4}$ g-Äquivalent freier Wasserstoffionen (aus dem p_H berechnet) und $6 \cdot 10^{-4}$ Gesamtwasserstoffionen (aus der elektrometrischen Titrationskurve bestimmt). Die bei der Koagulation adsorbierte Menge La-Ionen entspricht also mit genügender Genauigkeit der Menge *freier* Wasserstoffionen im Sol.

III.

Die Koagulationswerte verschiedener Kationen, d. h. die minimalen Konzentrationen, die zur vollständigen raschen Koagulation des Mastixsols genügen, ändern sich von Kation zu Kation in bekannter Weise: sie folgen angenähert der Regel von *Hardy-Schulze*. Wie dies an Arsentrisulfidsolen gezeigt wurde[1]), fällt der Koagulationswert mit der Wasserstoffionenkonzentration h nicht zusammen; bei allen Kationen ist der Koagulationswert (Kw) höher als h, und zwar um so mehr, je niedriger die Valenz des betreffenden Kations. Am kleinsten ist diese Diskrepanz bei dreiwertigen Kationen, Al, La usw., am größten bei einwertigen, K, Na usf.

Dieses Verhalten kann durch folgende Tabelle VI illustriert werden:

Tabelle VI.

Koagulationswerte verschiedener Kationen.
Milligrammäquivalente pro Liter.

Sol-Nr.	h_{frei} kond.	h_{frei} elektr.	h gesamt	Kw K	Ba	Al	La	Th
Mastix X	0,11	0,12	0,57	93	6,6	0,56	1,06	0,93
Mastix XI	0,09	0,037	0,39	75	6,0	0,53	—	0,93

In der ersten Horizontalreihe dieser Tabelle werden Koagulationswerte mit den h-Konzentrationen eines a-Mastixsols (2,80 g Mastix

---

[1]) *A. Rabinowitsch* und *W. Dorfmann*, l. c.

pro Liter enthaltend) verglichen; in der zweiten Horizontalreihe wird ein solcher Vergleich für ein *b*-Sol (1,95 g pro Liter) durchgeführt.

Die Koagulationswerte sind für alle Kationen höher als die aktuelle Acidität (h) des entsprechenden Sols. Für dreiwertige Ionen ist die Differenz nicht groß $\left(\text{etwa } \frac{Kw}{h_{\text{frei}}} = 5\right)$, mit Verminderung der Valenz des Kations wird sie immer größer und erreicht bei K den Wert $\frac{Kw}{h_{\text{frei}}} = 850$. Noch größer sind diese Quotienten bei dem *b*-Sol XI.

Im vorigen Abschnitt wurde gezeigt, daß die Adsorption der Kationen während der Koagulation in einer dem Gehalt des Sols an freien H^+-Ionen äquivalenten Menge erfolgt. Andererseits hat sich ergeben, daß die eingeführten Kationen freie Wasserstoffionen in äquivalenter Menge ersetzen, ohne dabei (von hydrolytisch gespalteten Salzen abgesehen) die Reaktion des Sols zu ändern.

Betrachten wir diesen Ersatz der Wasserstoffionen als erstes Stadium und unentbehrliche Bedingung für die Koagulation, so müssen wir schließen, daß diese Stufe in keiner Beziehung zur Regel von *Hardy-Schulze* steht. Hier spielt die Valenz des Kations keine Rolle, sondern tritt die Äquivalenz hervor. Nachdem alle freien H^+-Ionen durch fremde Kationen ersetzt sind und sich salzartige Verbindungen[1]) gebildet haben, kann die eigentliche Koagulation (Niederschlagsbildung) einsetzen. Hier ist die Valenz der Kationen (und zum Teil ihre individuelle Natur) maßgebend, was eben in der Regel von *Hardy-Schulze* Ausdruck findet.

In dieser Beziehung folgen die Mastixsole den von uns[2]) an Arsentrisulfidsolen festgestellten Regelmäßigkeiten vollkommen.

Zusammenfassung.

1. Es wurden an Mastixsolen gleichzeitig beide Methoden angewendet, die von uns früher zur Verfolgung des Koagulationsprozesses ausgearbeitet worden sind: die konduktometrische und die elektrometrische Titration mit Lauge und mit Salzlösungen.

2. Mastixsole, hergestellt durch Eingießen von Wasser in alkoholische Mastixlösung (*a*-Sole), unterscheiden sich von denjenigen, die durch Eingießen von alkoholischer Mastixlösung in Wasser (*b*-Sole) bereitet werden.

---

[1]) Wir wollen an dieser Stelle nicht die alte Frage berühren, ob es sich hier um rein chemische oder Adsorptionsverbindungen handelt, da zurzeit die Mittel zur Entscheidung dieser Frage fehlen.

[2]) l. c.



3. *a*-Mastixsole ergeben bei Laugentitration eine Leitfähigkeitskurve mit scharf ausgeprägtem Minimum, dessen Lage jedoch von derjenigen des Wendepunkts auf der elektrometrischen Titrationskurve stark abweicht.

4. *b*-Sole ergeben kein Minimum und keinen Wendepunkt auf den Leitfähigkeitstitrationskurven.

5. Die Wasserstoffionenkonzentrationen, die nach der konduktometrischen und der elektrometrischen Methode bestimmt werden, stimmen für die *a*-Sole ganz genau überein.

6. Bei den *b*-Solen ist dies nicht der Fall.

7. *b*-Sole lassen sich nur sehr langsam filtrieren.

8. *a*-Mastixsole sind stärkere Säuren als die *b*-Sole und bestehen aus kleineren Teilchen.

9. Bei der Koagulation von Mastixsolen mit Salzlösungen findet keine Ansäuerung statt.

10. Die freien Wasserstoffionen des Sols werden einfach gegen eingeführte Kationen ausgetauscht. Die Mastixsole sind also viel schwächere Säuren als Arsentrisulfidsole, aus welchen verschiedene Kationen sämtliche Wasserstoffionen freizusetzen imstande sind.

11. Verschiedene Kationen ersetzen Wasserstoffionen in äquivalenter Menge. Die Regel von *Hardy-Schulze* gilt für diesen Teilprozeß nicht; sie charakterisiert den darauf folgenden Teilprozeß der Ausfällung der gebildeten salzartigen (oder Adsorptions-) Verbindungen.

Zur Kenntnis des intermediären Purinstoffwechsels.

I. Mitteilung:

Fermentative Bildung von Harnsäurevorstufen im Blute.

Von

W. A. Engelhardt.

(Aus dem Biochemischen Institut des Kommissariats für Volksgesundheit in Moskau.)

(Eingegangen am 15. Januar 1927.)

Daß als unmittelbare Vorstufe der Harnsäure im Organismus die Oxypurine Xanthin und Hypoxanthin anzusehen sind, wurde schon seit langem, zuerst theoretisch, als wahrscheinlich angenommen, dann auch in zahlreichen und mannigfachen Stoffwechsel- und in vitro-Versuchen tatsächlich festgestellt. Es wurde angenommen, daß die Umwandlung unter dem Einfluß eines speziellen Ferments, der Xanthinoxydase, sich vollzieht. In jüngster Zeit zeigten *Morgan*, *Stewart* und *Hopkins*[1]), daß die Oxypurine unter dem Einfluß des oxydoreduzierenden Ferments der Milch (Schardingerenzym, Perhydridase) unter gleichzeitiger Reduktion gewisser Wasserstoffakzeptoren (Methylenblau, Nitrate, molekularer Sauerstoff) zu Harnsäure oxydiert werden. Diese Befunde wurden von *Bach* und *Michlin*[2]) bestätigt und haben dahin eine bedeutende Erweiterung gefunden, daß es nachzuweisen gelang, die Oxypurine seien nicht bloß Sauerstoffakzeptoren, die nur unter gleichzeitiger Reduktion anderer Substanzen (etwa Methylenblau, Nitrate, O_2) oxydiert werden, sondern daß sie unter dem Einfluß der Oxydoredukase, unter streng anaeroben Bedingungen, in Abwesenheit jeglicher anderer O-Akzeptoren einer hydrolytischen Oxydoreduktion —

---

[1]) *Morgan, Stewart* and *Hopkins*, Proc. Roy. Soc. **94**, 109.

[2]) *Bach* und *Michlin*, Ber. **60**, 82, 1927.

einer Art Dismutation — anheimfallen. Dabei entsteht Harnsäure, und es muß sich in äquivalenter Menge ein Reduktionsprodukt der Xanthinbase bilden, dessen chemische Natur vorläufig unaufgeklärt bleibt.

Bei der Unvollkommenheit unserer Kenntnisse über den Mechanismus und die Stätte des intermediären Purinstoffwechsels schien es mir von Interesse, nachzuprüfen, ob im Blute Verbindungen vorhanden sind, welche unter dem Einfluß oxydoreduzierender Fermente (z. B. in den Geweben) in Harnsäure übergehen können, und wie sich der Gehalt an solchen Substanzen beim Aufbewahren des Blutes verändert.

Damit waren aber für mich auch andere Fragen verknüpft, nämlich die Frage nach der Muttersubstanz des Blutammoniaks und der anorganischen Phosphorsäure.

Es hat bekanntlich in letzter Zeit in einer Reihe bemerkenswerter Untersuchungen *Parnas* mit Mitarbeitern[1]) nachgewiesen, daß im extravasierten Blute eine rasche Zunahme des Ammoniakgehalts stattfindet. Die Bildung des Ammoniaks geht nach *Parnas*' Versuchen auf Kosten der nichtkolloidalen Bestandteile des Blutes, ist aber nicht auf Desaminierung der Hauptbestandteile des „Reststickstoffes", des Harnstoffs und der Aminosäuren[2]), zurückzuführen. Vielmehr deutet schon *Parnas*[3]) darauf, daß man hier „an die Purinstoffe denken muß", jedoch hält er deren Menge für zu gering, damit ihre Desaminierung die ganze Menge des sich bildenden Ammoniaks liefern könnte. Aus den Versuchen *Parnas*' geht weiter hervor, daß die Ammoniakbildung beinahe ausschließlich an die Blutkörperchen gebunden ist und aus den nichtkolloidalen Bestandteilen unter dem Einfluß kolloidaler Stoffe sich vollzieht. Hämolyse und Fluoridzusatz üben keinen merklichen Einfluß auf den Vorgang aus. Ich hebe diese Befunde hier hervor, da ich später zu ihnen zurückkehren werde.

Andererseits haben in einer vor kurzem erschienenen Arbeit *Rona* und *Iwasaki*[4]) dargetan, daß im extravasierten Blute eine Anreicherung an anorganischer Phosphorsäure stattfindet, die auf Kosten nichtkolloidaler P-Verbindungen verläuft und ebenfalls durch Fluoridzusatz unbeeinflußt bleibt. Die Phosphorsäure soll aus esterartigen Verbindungen stammen, Näheres aber über ihre Muttersubstanz wird von den Autoren nicht berichtet. Ob sich die P-Abspaltung vorwiegend im Plasma oder in den Formelementen vollzieht, darüber finden wir in der Arbeit keine Angaben[5]).

In vorliegender Arbeit möchte ich über einen Prozeß berichten, der im Blute in vitro (und, aller Wahrscheinlichkeit nach, auch in vivo)

[1]) *Parnas* mit *Heller*, *Taubenhaus*, *Klisiecki*, diese Zeitschr. **152**, 1, 1924; **155**, 247, 1925; **159**, 298, 1925; **169**, 255, 1926; **172**, 442, 1926; **173**, 224, 1926.

[2]) *Parnas* und *Taubenhaus*, l. c., **159**.

[3]) *Parnas*, l. c. **152**.

[4]) *Rona* und *Iwasaki*, diese Zeitschr **174**, 293, 1926.

[5]) Nach den Arbeiten von *Lawaczek* (diese Zeitschr. **145**, 351, 1924) und *Martland*, *Hansman* und *Robison* (Biochem. Journ. **18**, 1152, 1924) findet auch dieser Prozeß hauptsächlich in den Blutkörperchen statt.

verläuft, und der, wie ich glaube, mit der Bildung von Ammoniak und anorganischer Phosphorsäure verknüpft sein muß. Hauptsächlich muß aber dieser Prozeß eine große Rolle beim Entstehen der Harnsäure und vielleicht auch im gesamten Purinstoffwechsel spielen. Es ist dies die Bildung von Harnsäurevorstufen, wahrscheinlich der Oxypurine Xanthin und Hypoxanthin.

Als erster hat *Scherer*[1]) berichtet, daß im Blute (bei Leukämikern) Hypoxanthin nachgewiesen werden kann. Diese Behauptung wurde zwar später von *G. Salomon*[2]) nicht bestätigt, jedoch machte der letztgenannte Forscher den höchst interessanten Befund, daß, während im frischen Aderlaßblut Hypoxanthin nie aufgefunden werden kann, dieses Oxypurin stets im Leichenblut vorhanden ist. Es ist besonders bemerkenswert, daß Hypoxanthin auch im Aderlaßblut, nach Aufbewahren desselben bei höherer Temperatur (24 bis 37°), sich nachweisen ließ, also im Blute neugebildet wurde.

Im Jahre 1920 haben *Bach* und *Sbarsky*[3]) gezeigt, daß im Blute Substanzen vorhanden sind, welche durch das oxydoreduzierende Ferment, unter gleichzeitiger Reduktion von Wasserstoffakzeptoren (Nitraten) oxydiert werden können. Nachdem *Hopkins* und Mitarbeiter[4]) dargetan haben, daß außer Aldehyden als Sauerstoffakzeptoren bei der Oxydoredukasewirkung Xanthin und Hypoxanthin funktionieren können, und *Dixons*[5]) eingehende Untersuchung gezeigt hat, daß, abgesehen von Aldehyden, diese beiden Oxypurine (vielleicht noch in sehr geringem Maße Adenin) die einzigen in Betracht kommenden Substrate der oxydierenden Wirkung der Oxydoredukase sind, lag es nahe, zu vermuten, daß eben diese Substanzen in den Blutkörperchen oxydiert werden.

Dies waren die Grundlagen, auf denen ich meine Versuche aufbaute. Als erste Frage stellte ich mir die, ob im Blute tatsächlich Harnsäurevorstufen vorhanden sind, die sich unter dem Einfluß oxydoreduzierender Fermente in Harnsäure überführen ließen. Weiter sollte nachgeprüft werden, ob und unter welchen Bedingungen die Menge dieser Substanzen sich im Blute verändert. Sollte ein Anstieg der Xanthinbasen stattfinden, so mußte das auf einer Desaminierung der Aminopurine und vielleicht einer vorhergehenden Spaltung von Nucleotiden beruhen. Dadurch wäre aber eine Quelle des Blutammoniaks[6]) und (vielleicht) der Phosphorsäure gefunden.

---

[1]) *Scherer*, Verh. d. phys. med. Ges. zu Würzburg 1851.

[2]) *G. Salomon*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **2**, 65, 1878–1879.

[3]) *A. Bach* und *Sbarsky*. C. r. de la Acad. Soc. **171**, 1175, 1920.

[4]) *Morgan*, *Stewart* and *Hopkins*, Proc. Roy. Soc. **94**, 109,

[5]) *Dixon*, Biochem. Journ. **20**, 703, 1926.

[6]) *Anmerkung bei der Korrektur*. Inzwischen erschien eine Mitteilung von *P. György* und *Röthler* (Klin. Wochenschr. **6**, 24, 1927), die ebenfalls die Bildung des Ammoniaks bei der Autolyse auf Desaminierung von Nucleinsubstanzen zurückführen.

Methodisches.

Es wäre gewiß am besten und sichersten, die etwa im Blute sich bildenden Xanthinbasen direkt zu bestimmen. Jedoch stehen keine Methoden zur Verfügung, die eine derartige Bestimmung bei den in Betracht kommenden äußerst geringen Mengen gestatten würden. Deswegen griff ich zu einer indirekten Methode, indem ich dem Blute Oxydoredukase zusetzte und die Menge der dabei gebildeten Harnsäure bestimmte. Man kann die auf diesem Wege erhaltenen Resultate gewiß kaum als absolute Werte betrachten, wohl geben sie aber eine gute Vorstellung vom *Gang* der Prozesse. Bei der absoluten Verwertung der Resultate muß man besonders in Betracht ziehen, daß keine H-Akzeptoren zugesetzt werden, und, falls solche im Blute selbst nicht vorhanden sind[1]), so gewinnen wir im besten Falle nur die Hälfte der Xanthinbasen als Harnsäure wieder, da die andere Hälfte reduziert werden muß.

Als Oxydoredukase wurde beinahe in allen Fällen eine Lösung des Trockenpräparats des Milchferments [vgl. *Sbarsky* und *Michlin*[2])] angewandt, welches mir liebenswürdig von Dr. *Michlin*, dem ich auch hier meinen aufrichtigen Dank aussprechen möchte, zur Verfügung gestellt wurde. In einigen Fällen wurde einfach frischer Rahm angewandt. Die Versuche wurden mit frisch gewonnenem defibrinierten Kaninchenblut, ohne Antiseptica- oder Pufferzusatz angestellt. Das Schema der Versuche war folgendes: Defibriniertes Blut (durch Herzstich oder aus der Ohrvene gewonnen) wird auf das Zehnfache mit destilliertem Wasser verdünnt und zu jeder Bestimmung Proben zu 5 ccm (entsprechend 0,5 ccm Blut) genommen. Zwei Proben (Kontrollen) kommen sofort ins kochende Wasserbad auf etwa 3 Minuten, die übrigen in den Brutschrank bei 37°. Eine der Kontrollproben dient zur Bestimmung des anfänglichen Harnsäuregehalts, die andere zur Bestimmung des ursprünglichen Gehalts an Harnsäurevorstufen. In späteren Versuchen, als es sich herausstellte[3]), daß der U^--Gehalt durch den Brutschrankaufenthalt niemals merklich verändert wird, wurde die entsprechende Kontrolle meist weggelassen. Nach einem gewissen Zeitintervall werden die Proben aus dem Thermostaten herausgenommen und, um den Prozeß abzubrechen, kurz aufgekocht (3 Minuten im Wasserbad), abgekühlt und nun zur Bestimmung der Oxypurine fortgeschritten. Es wird überall (außer den zur U^--Bestimmung dienenden Kontrollen) 0,25 ccm Oxydoredukaselösung bzw. Rahm zugesetzt, und die Probierröhrchen auf 30 Minuten in ein Wasserbad von 56 bis 60° gestellt. Während dieser Zeit vollzieht sich die Umwandlung der Xanthinbasen in Harnsäure, welch letztere nunmehr nach *Folin* und *Wu* unter Anwendung des *Benedict*schen Arsenphosphorwolframsäurereagens bestimmt wird. Es wird je 1 ccm 10proz. Natriumwolframat und $^2/_3$ n H_2SO_4 zugesetzt, durch *Schleicher-Schüll*sche Filter filtriert, vom Filtrate eine aliquote Menge, entsprechend 0,25 ccm Blut, mit 1 ccm 5proz. Silberlactatlösung versetzt, der Niederschlag nach 10 Minuten langem Stehen abzentrifugiert, durch Zusatz von 0,5 ccm 10proz. NaCl-Lösung in n/10 HCl zerlegt, nach Zugabe von 2 ccm Wasser wieder ausgeschleudert. Ein aliquoter Teil des Zentrifugats wird mit Wasser auf 2,5 ccm aufgefüllt, 2 ccm 5proz. NaCN-Lösung, 0,5 ccm des Harnsäure-

---

[1]) Diese Frage wird einer speziellen Untersuchung unterworfen.

[2]) *Sbarsky* und *Michlin*, diese Zeitschr. **155**, 486, 1925; **174**, 116, 1926.

[3]) In Gegensatz zu den von *Bornstein* und *Griesbach* (diese Zeitschr. **101**, 184, 1920) am menschlichen Blute erhaltenen Ergebnissen.

reagens zugegeben, nach 3 Minuten Verweilen im kochenden Bade rasch abgekühlt und sofort im *Authenrieth*schen Kolorimeter gegen einen geeichten Keil kolorimetriert. Als Vergleichsflüssigkeit zum Auffüllen des Keils gebrauchte ich eine wässerig-alkoholische Lösung von Kobalt-Ammonium-Rhodanid. Dieses Salz besitzt in rein wässeriger Lösung eine blaßrosa, in Alkohol eine tiefblaue Farbe. Versetzt man eine wässerige Lösung mit steigenden Mengen Alkohol, so erhält man alle Übergangsfarben, und es gelingt leicht, durch Vorversuche eine Nuance zu erzielen, die sehr gut der bei der *Benedict*schen U^--Bestimmung auftretenden entspricht. Dies findet bei etwa 50 Proz. Alkohol statt. Ist durch vorsichtigen Wasser- bzw. Alkoholzusatz die gewünschte Nuance erzielt, so wird der Keil sorgfältig verkorkt und mit frisch bereiteter Harnsäurelösung kalibriert. Er ist, soviel ich urteilen kann, unbegrenzt haltbar.

In den weiter unten angeführten Tabellen ist der gefundene U^--Wert auf 100 ccm Blut umgerechnet, also in Milligrammprozenten ausgedrückt. Es sei bemerkt, daß bei mir das *Benedict*sche Reagens allein stets eine, wenn auch schwache Färbung ergab. Der dieser Eigenfärbung entsprechende Blindwert wurde stets von dem im Versuch erhaltenen Werte abgezogen.

Vorversuche haben gezeigt, daß bereits 0,01 ccm der angewandten Oxydoredukaselösung bzw. des Rahms die gleiche Menge Harnsäure lieferten wie z. B. 0,25 ccm. Um jedoch sicher zu sein, daß die Umwandlung möglichst quantitativ geschieht, wurde in allen Versuchen eben ein großer Überschuß an Ferment genommen (0,2 bis 0,25 ccm).

Versuchsergebnisse.

Gehalt an Harnsäure und deren Vorstufen vor und nach dem Brutschrankaufenthalt.

Beim Aufbewahren des Blutes während 6 Stunden im Thermostaten läßt sich keine wesentliche Veränderung des ursprünglichen U^--Gehalts vermerken. Der ursprüngliche Gehalt an Substanzen, die unter dem Einfluß von Oxydoredukase in Harnsäure übergehen können, ist äußerst gering. Nach 6 Stunden langem Verweilen bei 37⁰ kann diese Menge auf das 100fache anwachsen.

Tabelle I.

Harnsäure in Milligrammprozenten.

	Vorgebildet	Nach Zusatz von Oxydoredukase erhalten	Also aus Vorstufen gebildet.
Ursprünglich	0,32	0,44	0,12
Nach 6 Stdn. bei 37⁰ . .	0,32	12,2	11,88

Zeitlicher Verlauf der Bildung von Harnsäurevorstufen.

Defibriniertes Blut, zehnfach mit Wasser verdünnt, kommt in den Thermostaten, es werden nach bestimmten Zeitintervallen Proben entnommen, im Wasserbad aufgekocht und weiter in Eis aufbewahrt, dann alle (außer der Probe Nr. 8, die am nächsten Tage verarbeitet wurde) der weiteren Untersuchung unterworfen.



Tabelle II.

Nach Einwirkung von Oxydoredukase gefundene U^--Mengen in Milligrammprozenten.

Probe Nr.	Dauer des Verweilens des Blutes bei 37° Stdn.	mg-Proz. U^-	Probe Nr.	Dauer des Verweilens des Blutes bei 37° Stdn.	mg-Proz. U^-
1	0	0,44	5	4	10,0
2	1	0,6	6	6	12,2
3	2	4,6	7	8	15,6
4	3	8,0	8	24	9,0

Da der Versuch nicht aseptisch durchgeführt wurde, kann dem Werte für 24 Stunden keine besondere Bedeutung zugeschrieben werden, es ist mit der Möglichkeit bakterieller Zersetzung zu rechnen. In den anfänglichen Stadien weist der Prozeß einen ständigen Verlauf auf.

Einfluß der Temperatur.

Proben zu je 0,5 ccm defibrinierten Blutes, mit Wasser auf das Zehnfache verdünnt, werden 3 Stunden bei verschiedener Temperatur belassen, dann gleichzeitig aufgekocht und nach Einwirkung von Oxydoredukase auf den U^--Gehalt untersucht.

Tabelle III.

Das Blut 3 Stdn. aufbewahrt bei:	0°	17°	37°	56°	Kontrolle
mg-Proz. U^-	0,4	1,12	7,5	2,2	0,44

Bei 0° läßt sich keine Neubildung der U^--Vorstufen beobachten — der Wert ist demjenigen des Kontrollversuchs gleich; bei 56° ist die Ausbeute geringer als bei 37° — offenbar findet bei dieser Temperatur eine teilweise Zerstörung der am Prozeß beteiligten Fermente statt.

Lokalisierung des Prozesses in den einzelnen Blutbestandteilen.

Defibriniertes Blut wird scharf zentrifugiert, das Serum abgehoben, die Blutkörperchen einmal mit etwa der 15fachen Menge physiologischer NaCl-Lösung nachgewaschen, abermals zentrifugiert. Es kommen in die Proben je 0,5 ccm Serum, Blutkörperchen bzw. Vollblut, alles mit 4,5 ccm physiologischer Kochsalzlösung verdünnt. 3 Stunden im Thermostaten aufbewahrt. Kontrollversuch mit Vollblut angestellt. Entsprechend dem hohen Chloridgehalt der Versuchslösungen, bei der Harnsäurebestimmung 2,5 ccm Silberlactatlösung genommen.

Tabelle IV.

Zum Versuch genommen 0,5 ccm	Serum	Blutkörperchen	Vollblut	Kontrolle
mg-Proz. U^-	0,32	5,6	3,6	0,4

Die Bildung der Harnsäurevorstufen ist praktisch ausschließlich an die Blutkörperchen gebunden. Beim Aufsaugen der Blutkörperchen führte ich die Pipette bis auf den Boden des Zentrifugenröhrchens, um hauptsächlich die Erythrocyten zu gewinnen. Es scheint mir wenig wahrscheinlich, daß an der Bildung der Xanthinbasen die Leucocyten in bedeutendem Maße beteiligt seien. Vielmehr denke ich, daß der Prozeß sich in den roten Blutkörperchen vollzieht.

Einfluß von Fluorid, Oxalat und Cyanid.

Zu jedem Versuch werden zwei Proben zu 5 ccm zehnfach mit Wasser verdünnten, defibrinierten Blutes (= 0,5 ccm Blut) genommen. Beide Proben verweilen im Thermostaten, es wird aber zur Probe „a" die zu prüfende Substanz von Anfang an zugesetzt, zur Probe „b" dagegen erst nach dem Herausnehmen aus dem Brutschrank. Die zweite Probe wird angestellt, um den Einfluß der untersuchten Substanzen auf den weiteren Verlauf der Bestimmung klarzulegen, was durch den Vergleich mit einer weiteren, gleichzeitig ohne jeglichen Zusatz angestellten Probe möglich wird.

Tabelle V.

Zusatz:	H_2O	NaF, 2 Proz. 0,5 ccm		Na-Oxalat, 2 Proz. 0,5 ccm		NaCN, m/100 0,5 ccm		Kontrolle
		a	b	a	b	a	b	
mg-Proz. U^-	10,0	8,9	10,9	8,0	9,9	4,2	4,4	0,6

Fluorid und Oxalat beeinflussen den Prozeß ganz unwesentlich, Cyanid hemmt augenscheinlich nicht die Bildung der Harnsäurevorstufen (die Werte in „a" und „b" sind praktisch gleich), stört aber entweder die Wirkung der Oxydoredukase oder der endgültigen Harnsäurebestimmung (etwa bei der Silberfällung).

Einfluß der Hämolyse.

Zwei Blutproben zu 0,5 ccm werden versetzt, die eine mit 2,25 ccm 1,7proz. NaCl-Lösung, die andere mit der gleichen Menge destillierten Wassers. Nachdem in der zweiten Probe die Hämolyse sich vollzogen hat, wird zur ersten 2,25 ccm Wasser, zur zweiten 2,25 ccm der NaCl-Lösung hinzugefügt. Die endgültige Zusammensetzung der beiden Proben ist die gleiche. Beide kommen in den Thermostaten auf 2½ Stunden und werden dann in üblicher Weise verarbeitet. Bei der Harnsäurefällung wird die doppelte Menge (2 ccm) Silberlactatlösung genommen, entsprechend dem hohen Chloridgehalt.

Tabelle VI.

Probe:	Hämolysiert	Nicht hämolysiert
mg-Proz. U^- .	2,6	2,5

Es läßt sich kein Einfluß der Hämolyse feststellen. Die verhältnismäßig geringe Ausbeute an Harnsäure ist vermutlich auf die störende Wirkung der Chloride bei der Isolierung der Harnsäure zurückzuführen.

Diskussion.

Der indirekte Weg, auf dem ich bei meinen Versuchen die Anwesenheit der Harnsäurevorstufen bestimmte, scheint mir zugleich auch gewisse Vorteile zu besitzen, da er gerade diejenigen Substanzen zu fassen erlaubt, aus denen physiologisch, unter dem Einfluß der oxydoreduzierenden Fermente der Gewebe, die Harnsäure entstehen muß. Es ist vorläufig nicht mit Sicherheit zu entscheiden, ob wir dabei mit freien Oxypurinen oder deren Nucleosiden zu tun haben. Jedenfalls müssen sie letzten Endes aus den Aminopurinnucleosiden bzw. -nucleotiden herstammen.

In der Literatur ließen sich keine Hinweise auf das Vorhandensein von Nucleosiden im kreisenden Blute finden. *Thannhauser*[1]) meint, es werden nicht freie Purine, sondern Purin-Kohlehydrat-Phosphorsäurekomplexe, also Nucleotide, aus dem Darm resorbiert, und eben sie gelangen auch in den intermediären Stoffwechsel. *Jackson*[2]) hat auch direkt die Anwesenheit von Adeninnucleotid im Blute nachgewiesen. Wenn tatsächlich die Nucleotide als Quelle der Harnsäure im Blute dienen, so muß ihre Umwandlung in die unmittelbaren Vorläufer der Harnsäure, das ist in die Xanthinbasen oder deren Nucleoside, wenigstens einen Teil der sich im Blute in vitro bildenden Phosphorsäure liefern. Was die zweite Stufe des Prozesses betrifft, nämlich die Desaminierung, so kann diese sowohl an freien, etwa durch Zerfall der Nucleoside entstandenen Aminopurinen stattfinden, oder aber noch vor einer solchen Spaltung, also an den Aminopurinnucleosiden selbst. Nach Versuchen von *Amberg* und *Jones*[3]) scheint die zweite Möglichkeit wahrscheinlicher zu sein, da es sich feststellen ließ, daß z. B. Schweineleber aus Nucleinsäure primär Xanthosin bildet, welches durch weitere Hydrolyse Xanthin liefert; ebenfalls vermag Hundeleber nicht aus freiem Adenin Hypoxanthin zu bilden, wohl aber aus dessen Nucleotid, offenbar auf dem Wege über Adenosin und Inosin. Auch aus ihren Stoffwechselversuchen mit Adenosin und Guanosin schließen *Thannhauser* und *Bommes*[4]), daß „als intermediäre Vorstufen der Harnsäure im Stoffwechsel die Purinzuckerverbindungen anzusprechen sind". An diesen vollzieht sich die Desaminierung und vielleicht auch die Oxydation, so daß die Zuckerabspaltung erst nach der Bildung der Harnsäure zustande kommt. Mit dieser Annahme wäre der Befund von *Davis* und *Benedict*[5]) in Einklang zu bringen, welche eine mit Silber nicht fällbare Harnsäure-Pentoseverbindung aufgefunden haben. Allerdings kommt *Thannhauser* in einer späteren Arbeit[6]) zu dem Schluß, daß gleichzeitig

[1]) *Thannhauser* und *Czoniczer*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **110**, **307**, **1920**.
[2]) *Jackson jr.*, Journ. of biol. Chem. **9**, 529, 1924.
[3]) *Amberg* und *Jones*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **78**, 407, 1911.
[4]) *Thannhauser* und *Bommes*, ebendaselbst **91**, 336, 1914.
[5]) *Davis* und *Benedict*, Journ. of biol. Chem. **45**, 1921.
[6]) *Thannhauser* und *Ottenstein*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **114**, **17**, **1921**.

mit der Desaminierung (vielleicht infolge letzterer) die Purin-Zuckerbindung zerfällt. Es entstehen deswegen bei der Umwandlung der Nucleoside weder freie Aminopurine, noch Oxypurin-Nucleoside, sondern nur freie Xanthinbasen, und als weitere Oxydationsstufe Harnsäure.

Ich neige eher auch der Meinung zu, daß nicht die freien Aminopurine, sondern ihre Nucleoside desaminiert werden. Ich konnte nämlich bei Zusatz von Guanin zum Blute keine Steigerung der Bildung von Harnsäurevorstufen beobachten, es wurde demnach das Guanin offenbar nicht desaminiert. Jedoch sind die diesbezüglichen Versuche nicht zahlreich genug, um aus ihnen sichere Schlüsse zu ziehen, und die Frage muß Gegenstand weiterer Untersuchungen bleiben.

Wenn wir uns jetzt meinen Versuchsergebnissen zukehren, so möchte ich vor allem darauf aufmerksam machen, daß die hier beschriebene Bildung von Harnsäurevorstufen viel gemeinsames mit der von *Parnas* untersuchten Ammoniakbildung hat. Als besonders bedeutungsvoll betrachte ich den Umstand, daß beide Prozesse sich vorwiegend oder sogar ausschließlich in den Formelementen des Blutes vollziehen. Weiter sei bemerkt, daß Hämolyse in beiden Fällen gar keinen, Fluoridzusatz höchstens nur einen ganz unbedeutenden hemmenden Einfluß auf die Prozesse ausübt. Es hängen somit beide nicht von der Intaktheit der Zellenstruktur ab, stehen auch nicht in Zusammenhang mit den glykolytischen Prozessen. Es sei hier erinnert, daß nach *Ronas* Versuchen der Fluoridzusatz auch die Abspaltung von freier Phosphorsäure unbeeinflußt läßt. Eine Hemmung des Prozesses durch Cyanid (bei einer Endkonzentration desselben m/1000) ließ sich nicht beobachten. Die Anwesenheit von Ca-Ionen ist, nach den Versuchen mit Oxalatzusatz zu urteilen, auch für den Prozeß belanglos.

Mit allem Vorbehalt und wohl bewußt dessen, wie wenig die angewandte Methode für quantitative Ziele geeignet ist, möchte ich mir jedoch erlauben, folgende Berechnungen anzuführen: sollte ein halbes Milligrammol Adeninnucleotid, in 100 ccm Blut enthalten, einer Spaltung, Desaminierung und Oxydation bis zur Harnsäure anheimfallen so müßten dabei 8,4 mg-Proz. Harnsäure, 0,85 mg-Proz. NH_3 und 7,1 mg-Proz. P_2O_5 im Blute auftreten. In meinen Versuchen konnte nach 3 Stunden langem Aufbewahren bei 37° zwischen 4,8 und 8,4 mg-Proz. Harnsäure erhalten werden, was vielleicht der Bildung einer doppelten Menge Xanthinbasen entspricht. Bei *Parnas* finden wir nun nach etwa derselben Zeit (allerdings bei 20°) Zahlen von 0,644, 0,65; nach 4 Stunden bei 20° 0,78 mg-Proz. NH_3. Und endlich in der Arbeit von *Rona* und *Iwasaki* wird nach 3 Stunden bei 37° eine Neubildung von 3 bis 4 mg-Proz. P_2O_5 beobachtet. Wir sehen, daß wenigstens der Größen*ordnung* nach die angeführten Zahlen die oben ausgedrückte Annahme zu berechtigen scheinen, daß der Ursprung der sich im Blute bildenden NH_3 und anorganischer Phosphorsäure in einer Spaltung und Desaminierung von Nucleotiden liegen kann.

Als diese Arbeit schon druckfertig vorlag, erschien die höchst interessante Mitteilung von *Euler* und *Nilsson*[1]), denen es gelang, im Blute, und nämlich in den Erythrocyten, beträchtliche Mengen Cozymase nachzuweisen. Soweit nach den Arbeiten *Eulers* die Cozymase gleichzeitig als Coferment der Oxydoredukase dient, letztere Eigenschaft aber auch den Harnsäure-

---

[1]) *H. v. Euler* und *Nilsson*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **162**, 63, 1926.



vorstufen zukommt, drängt sich von selbst die Vermutung auf, ob nicht eben in diesen Substanzen die Cozymase zu suchen ist. Dafür würde auch der außerordentlich hohe Cozymasegehalt der nucleinreichen Vögelerythrocyten sprechen. In gelegentlich angestellten orientierenden Versuchen konnte ich beobachten, daß im Vogelblut neben großen Mengen freier Harnsäure, auch bedeutend mehr an vorgebildeten Harnsäurevorstufen vorhanden ist als im Kaninchenblut.

Zusammenfassung.

1. Wird defibriniertes Kaninchenblut aufbewahrt, so bilden sich in ihm Substanzen, welche unter dem Einfluß von oxydoreduzierenden Fermenten in Harnsäure übergehen.

2. Die Bildung der Harnsäurevorstufen ist an die Formelemente, wahrscheinlich an die Erytbrocyten, gebunden.

3. Bei 0^0 läßt sich die Bildung der U^--Vorstufen nicht beobachten. Sie erreicht bei 37^0 ihr Maximum, bei 56^0 nimmt sie wieder ab.

4. Der Prozeß wird durch Fluorid-, Oxalat- bzw. Cyanidzusatz, auch durch Hämolyse nicht wesentlich beeinflußt.

5. Es wird auf die Wahrscheinlichkeit hingewiesen, daß der beobachtete Prozeß zugleich als Ursache der Ammoniakbildung und der Bildung von anorganischer Phosphorsäure im Blute in vitro dienen kann.

Über die Absorption des Lichtes durch die Blätter der Pflanzen und die Absorption von Chlorophyllösungen.

Von

P. Lasareff.

(Aus dem Institut der Physik und Biophysik zu Moskau.)

(Eingegangen am 15. Januar 1927.)

Mit 2 Abbildungen im Text.

Für die Erforschung der Probleme der photochemischen Reaktionen in grünen Blättern der Pflanzen ist es interessant, einen Vergleich der Absorption der Blätter mit derjenigen der Chlorophyllösung anzustellen. Bis jetzt war es bekannt, daß qualitativ das Absorptionsspektrum des Chlorophylls und das Spektrum des Blattes identisch sind und in denselben Gegenden des Spektrums die Absorptionsmaxima zeigen. Es wäre interessant, eine quantitative vergleichende Untersuchung dieser Spektra vorzunehmen.

Die Methode.

Die Methode der Erforschung der Absorption der Blätter bestand darin, daß ein frisches Blatt einer Pappel B in einen engen Trog T gesetzt wurde, welcher mit Wasser gefüllt ist (Abb. 1). Dieser Trog ist vor eine Spalte Sp des *Lummer-Brodhun*schen Spektrophotometers gestellt[1]).

T B Sp

Abb. 1.

Eine zweite Spalte wurde mit der Lichtquelle beleuchtet. Die von dieser Quelle ausgehende Lichtintensität kann mit *Brodhuns*[2]) Sektorenmeßvorrichtung gemessen und abgeschwächt werden. Die ganze Anordnung ist mit derjenigen identisch, welche ich bei der Absorption von Farbstoffen gebraucht habe[3]).

---

[1]) *O. Lummer* und *E. Brodhun*, Zeitschr. f. Instrkde. **12**, 132, 1892.
[2]) *E. Brodhun*, Zeitschr. f. Instrkde, **14**, 310, 1894.
[3]) *P. Lasareff*, Ann. d. Phys. (4) **37**, 813, 1912.

Bei der Untersuchung der Chlorophyllösungen wurde ein alkoholischer Extrakt von trockenen Blättern einer Brennessel bereitet, die zuerst mit Benzol begossen und dann mit Alkohol extrahiert wurden; nach der Filtration wurde der alkoholische Extrakt bei einer passenden Verdünnung in denselben Trog eingegossen, in welchem das frische Blatt sich befand.

Die Versuche, direkt die relative Intensität des durchgehenden Lichtes zu messen, gestatten uns, wenn wir J_0 die Intensität des auffallenden Lichtes, J_1 die Intensität des Lichtes, die durch unsere Präparate durchgegangen ist, nennen, die Größe J_1/J_0 experimentell zu messen und daraus die relative absorbierte Energie $A = 1 - J_1/J_0$ zu bekommen. (Maximale absorbierte Energie ist gleich 1).

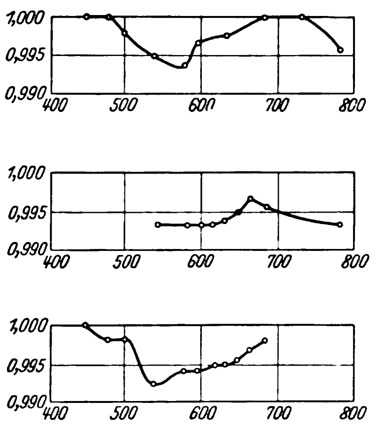
Tabelle I.

λ	502	514	528	543	559	576	585	595	606	617	630	644	660	680	780
A	0,42	0,30	0,36	0,38	0,44	0,52	0,60	0,64	0,72	0,74	0,77	0,89	0,97	0,80	0,37

Tabelle II.

a	λ	445	472	502	535	576	595	617	630	644	660	680
	A	1,000	0,998	0,998	0,992	0,994	0,994	0,995	0,995	0,996	0,997	0,998
b	λ	—	535	576	595	617	630	644	660	680	780	—
	A	—	0,993	0,993	0,993	0,993	0,994	0,995	0,997	0,996	0,993	—
c	λ	445	472	502	535	576	595	630	680	730	780	—
	A	1,000	1,000	0,998	0,995	0,994	0,997	0,998	1,000	1,000	0,996	—

Diese Größe wurde in Tabelle I und II wiedergegeben, wobei die Tabelle I die Absorptionsverhältnisse bei Chlorophyllösung, die Tabelle II die Absorptionserscheinungen bei frischen Blättern (a, b, c) darstellt.



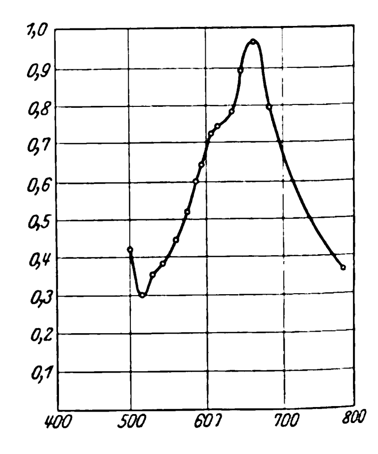


Abb. 2.

Die in den Tabellen I und II angeführten Daten sind graphisch in Abb. 2 dargestellt, wobei die Abszissen die Wellenlängen, die Ordinaten A sind.

Die Absorption von Blättern wurde in 20fachem Maßstab gegeben, im Vergleich zu der Absorption der Chlorophyllösungen.

Aus der Abb. 2 können wir ersehen, daß die Lagen der Absorptionsmaxima der Lösungen und der Blätter eine approximative Übereinstimmung aufweisen, wobei auch die sekundären Maxima in einigen Kurven existieren, welche im Chlorophyllspektrum vorhanden sind.

Die Absorption im grünen Blatte ist sehr groß, und nur 1 bis 2 Proz. der auffallenden Energie können durch das Blatt gehen. Wir können infolgedessen das Blatt als einen absolut schwarzen Körper betrachten.

Über das Wesen der Autolyse.

VII. Mitteilung:

Beiträge zur Kenntnis der Organautolyse.

Von

O. Steppuhn und Y. Duret-Delage.

(Aus dem staatl. Chemo-Pharmazeutischen Forschungsinstitut in Moskau.)

(Eingegangen am 15. Januar 1927.)

In einer früheren Mitteilung[1]) haben wir berichtet, daß unter gewissen Bedingungen, namentlich Schilddrüsenfütterung, die Autolyse ganzer Tiere (Mäuse) einen enormen Anstieg erleidet, und zwar wie im Tryptase-, so auch im Pepsinasebereich; andererseits war die Autolyse in saurer Pufferung in allen von uns beobachteten Fällen stärker als in alkalischer Pufferung. Nun ist bei einem solchen in-toto-Versuch der Verdauungswert immer ein Mittelwert aus den Einzelwerten der autolysierenden Organe. Es könnte ja sein, daß die überwältigende Leberproteinspaltung geringere Werte im sauren Milieu, gegenüber der tryptischen Verdauung, bei irgendwelchen Organen verdeckt. Es war somit interessant festzustellen, ob die Autolyse im sauren Milieu bei anderen Organen auch stärker als im alkalischen Bereich oder bei praktisch neutraler Reaktion ist. Insbesondere interessierte uns die Bauchspeicheldrüse; es war zu erwarten, daß deren Trypsin seine Tätigkeit in solchen Dimensionen offenbaren würde, daß die saure Autoproteolyse zurückbleiben müßte. Daß dieses nicht der Fall war, wird man aus dem Weiteren ersehen.

Methodisch wurde wie sonst [siehe frühere Mitteilungen, diese Zeitschr.[1])] verfahren: 10 bis 20 Proz. Gewebsemulsionen wurden unter Pufferung der Autolyse bei 37° für 2 bis 3 Tage überlassen. Die Enteiweißung geschah mittels Kupfersulfat-Natronlauge, die Berechnung — wie in den vorhergehenden Mitteilungen — zeigt den Proteinzerfall in Prozenten an.

Die Tabelle I gibt eine Vorstellung über das Verhältnis zwischen den Verdauungszahlen im sauren und schwach alkalischen Milieu von

---

[1]) Diese Zeitschr. **175**, 471, 1926.

Kaninchenorganen, Tabelle II von Hundepankreas[1]) und Niere. Einige Organe gelangten mehrere Male zum Versuch, in diesen Fällen gibt die Tabelle I Mittelwerte an.

Tabelle I.

Kaninchen. Dauer der Autolyse zweimal 24 Stunden.

Organ	$p_H = 3{,}8$	$p_H = 7{,}5$
Leber	73,5	5,5
Niere	75,9	3,3
Herz	12,8	10,9
Muskel	6,4	1,4
Lunge	40,5	3,3

Wie die Tabelle I zeigt, ist die Intensität des Proteinzerfalls für die einzelnen Organe recht verschieden, die absoluten Werte für Niere und Leber im sauren Milieu stehen an der Spitze und sind enorm; die Verdauung im tryptischen Bereich ist dagegen verschwindend klein, Muskelgewebe autolysiert überhaupt sehr schwach, aber auch hier ist die Proteinspaltung im sauren Milieu etwa fünffach gegenüber dem schwach alkalischen. Das Herzmuskelgewebe gibt ganz andere und einzig dastehende Zahlen; das Verhältnis von Pepsinase zu Tryptaseverdauung ist nahezu = 1. Bemerkenswert ist es aber, daß wohl alle Organe, wie es scheint, Pepsinasen besitzen, deren Aktivität immer größer ist als die der Tryptasen, was wohl nochmals die physiologische Bedeutung dieser Fermentgruppe und damit die Möglichkeit und Notwendigkeit von Wasserstoffionenansammlung in einzelnen Teilen der Zelle bei Eiweißumsetzungen hervorhebt.

Es seien nun unsere besonderen, der vergleichenden Pankreasautolyse gewidmeten Versuche angeführt.

Tabelle II.

Dauer der Autolyse zweimal 24 Stunden.

Pankreas		Niere	
$p_H = 3{,}8$	$p_H = 7{,}6$	$p_H = 3{,}8$	$p_H = 7{,}6$
Proteinzerfall in Proz.			
51,63	26,25	58,65	4,98
57,83	32,28	77,31	5,36
69,09	40,49	69,26	7,11
64,83	37,09	71,03	6,48
60,71	47,29	76,12	8,08
56,37	33,14	65,66	8,60

[1]) Es wurde Hundepankreas autolysiert, weil der Autolyseversuch immer mit einem andersartigen, dessen Selbstzweck Pankreasexstirpation war, kombiniert wurde.

Schon aus dieser Tabelle ersieht man, daß die Bauchspeicheldrüse im Vergleich mit anderen Organen enorme Tryptasenaktivität besitzt: diejenigen Tryptasen, die bei entsprechender Verarbeitung des Organs das Pankreatin und schließlich Trypsin liefern. Es ist nicht verwunderlich, wenn bei schwerer Pankreasschädigung eine Ausfuhr von Aminosäuren in den Harn stattfindet, welche die Kliniker sonst besonders auch bei Leberschädigungen beobachten. Nun erhält aber die Leber im Verhältnis zum Pankreas nur ganz geringe Mengen Tryptasen, und wenn dort katastrophale Eiweißeinschmelzungen stattfinden, so ist immer damit zu rechnen, daß es die *Leberpepsinasen besorgen*; es ist auch ganz charakteristisch, daß Leberschädigungen — sei es durch Gifte wie Phosphor, Chloroform usw., oder durch innere, bekannte oder manchmal unbekannte Ursachen — stets von einer Acidosis begleitet sind. Diese Acidosis ist vielleicht gerade diejenige Optimalbedingung, welche den Pepsinasen freien Lauf gibt, denn sonst wäre es nicht verständlich, weshalb Zellschädigungen anderer Organe nicht von einer gleichen NH_2-Ausfuhr begleitet sind, wo doch die Verdauung im Pepsinasebereich der Niere z. B. mindestens so stark ist, wie die der Leber. In allen Organen haben wohl die Pepsinasen Arbeitsgelegenheit, was eventuell durch temporäre oder momentane Ansammlungen von H-Ionen an bestimmten Punkten des Protoplasmas geschieht. *Dauernde und so oft unphysiologische Acidosis ist natürlich ein davon gänzlich verschiedener Prozeß.* Man kann eben nicht umhin, zu behaupten, daß alle Leberschädigungen mit Glykogenverarmung, sicher mit Fetteinwanderungen und dann mit Ketonkörperacidosis einhergehen. Wir wissen nicht, ob andere Organe Ketonkörperspender sind; für die Leber ist es sicher. Es muß auch noch in Betracht gezogen werden, daß wir das saure Milieu willkürlich überall mit $p_H = 3{,}8$ gewählt haben. Für die Leber ist es ungefähr die optimale Wasserstoffionenkonzentration der Pepsinasen, für andere Organe braucht es ja nicht der Fall zu sein, somit wäre bei gefundenem Optimum eine noch stärkere Verdauung zu erwarten.

Wir wollen noch einige Versuche über Pankreasautolyse bei $p_H = 3{,}8, 7{,}1, 7{,}6$ und Wasser anführen (Tabelle III). Es ist bezeichnend und nur für dieses Organ gültig, soweit uns bekannt, daß die *Autolyse im Wasser noch stärker ist als im sauren Milieu.* Dieses ist dadurch zu erklären, daß beim Beginn der Autolyse die Tryptase eine ausgiebige Spaltung vorbereitet, was auch schon daraus ersichtlich ist, daß die Verdauung bei $p_H = 7{,}1$ geringer ist als bei $p_H = 7{,}6$; wenn später die Eigenpufferung durchbrochen ist, dann tritt die Pepsinase in ihre Rechte und löst weitere Proteinbruchstücke ab. Bei anderen Organen ist ein solches Tryptasenstadium verschwindend klein.

Tabelle III.

Dauer der Autolyse	$p_H = 3,8$	$p_H = 7,1$	$p_H = 7,6$	Wasser
3 Tage	62,4	45,9	49,0	74,6
2 „	53,2	36,7	45,2	66,7
3 „	65,0	48,7	55,7	72,9

Wir mußten weiterhin die Gewißheit gewinnen, daß die große Tryptasenaktivität des Pankreas tatsächlich vom Trypsingehalt des Organs herstammt. Es könnte gut möglich sein, daß gerade der Trypsingehalt Vorrichtungen verlangt, um gegen jede mögliche Läsion der Zellen, welche mit einem Durchbruch der tryptischen Verdauung *intracellulär* einhergehen würde, zu arbeiten. Wir mußten mit anderen Worten entscheiden, ob Pankreatin, z. B. zu einem Pankreasautolysat zugegeben, die Verdauung der Drüse erhöht. Es ist tatsächlich der Fall; wenn wir die Tabelle IV betrachten, so sehen wir, daß zugesetztes Pankreatin die Verdauung bei $p_H = 7,6$ ganz enorm erhöht hat; es ist somit kein Zweifel, daß die Pankreasdrüse keine Verrichtungen gegen Eigentrypsinwirkung besitzt und daß das Trypsin den starken Proteinzerfall im alkalischen Milieu bedingt.

Tabelle IV.

0,2 Proz. Pankreatin, davon 1 Proz. Drüsengewicht hinzugegeben.

$p_H = 3,8$		$p_H = 7,6$	
ohne Pankreatin	mit Pankreatin	ohne Pankreatin	mit Pankreatin
60,71	75,25	47,29	63,95
57,37	78,38	33,14	50,25
51,96	80,57	30,50	69,25

Merkwürdigerweise wird bei der sauren Pufferung mit Zusatz von Pankreatin mehr verdaut, als ohne Pankreatin. Dieses läßt daran denken, daß das Pankreatin auch eine Pepsinase enthält, was von der Zubereitungsart abhängen muß. Bei der anfänglichen Fällung des Drüsenextrakts mit Alkohol gerät die Pepsinase natürlich mit in den Niederschlag.

Fassen wir die dargebrachten Versuche nochmals kurz zusammen, so sehen wir, daß in allen von uns untersuchten Organen *die Verdauung im Pepsinasebereich dominiert,* besonders bei Leber und Niere. Es muß den *Organpepsinasen eine besondere und wichtige physiologische Rolle* zugeschrieben werden, besonders wenn man in Betracht zieht, daß bei erhöhtem N-Umsatz auch die Aktivität der Pepsinasen enorm steigt (l. c.). Diese physiologische Rolle kann natürlich nur bei *lokaler*

Säuerung an gewissen Stellen des Zellprotoplasmas ausgespielt werden; diese Säuerung ist recht bedeutend ($p_H = 3$ bis 4).

Die Bauchspeicheldrüse ergibt auch im Tryptasenbereich sehr große Verdauungszahlen, was durch Eigentrypsin der äußeren Sekretion bedingt wird. Es ist verständlich, daß bei Zelläsionen des Pankreas die Drüse einer Verdauung durch diese Fermentmassen anheimfallen kann, desto mehr, daß die *Organzellen keine Abwehrkräfte dagegen besitzen* (Tabelle IV).

Die Leber, arm an Tryptasen, *ist ein reiches Pepsinasendepot,* die Ausfuhr von Rest-N bei Leberschädigungen ist ein Resultat der Pepsinasearbeit, vielleicht hervorgerufen und reguliert durch einhergehende Ketonkörperacidosis.

Die Beziehung des Katalasesystems zu den Oxydationsvorgängen in den Tiergeweben.

Von

L. Stern.

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Moskau.)

(Eingegangen am 17. Januar 1927.)

Im Jahre 1901 ist von *Loew* (42) der Beweis erbracht worden, daß die Zersetzung des H_2O_2 durch Tier- und Pflanzengewebe von einem spezifischen Ferment bewirkt wird, dem er den Namen Katalase gab. Seit dieser Veröffentlichung haben sich zahlreiche Forscher mit dem Studium dieses Ferments beschäftigt, und die Zahl der Arbeiten wächst mit jedem Tage. Nicht nur die Physiologie und die Biochemie, sondern auch die Pharmakologie, die Pathologie und nicht als letzte die Klinik, haben dieser Frage ihre Aufmerksamkeit zugewandt. Die Kinetik sowie die physikalischen und chemischen Eigenschaften der Katalase sind genau erforscht, aber über die Rolle dieses quasi ubiquitären Ferments weiß man heute noch ebensowenig wie im Anfang, trotz der zahllosen Untersuchungen, die sich gerade mit dieser Seite des Problems befaßt haben. Zahllose Hypothesen sind von den verschiedenen Forschern aufgestellt worden, aber keine einzige hat sich bisher als völlig befriedigend erwiesen.

Eines steht fest, nämlich, daß die Katalase in allen daraufhin untersuchten Geweben der aerob lebenden Tier- und Pflanzenorganismen vorhanden ist, während sie bei den Anaerobiern vermißt wird. Quantitative Untersuchungen haben ergeben, daß die Verteilung dieses Ferments eine sehr ungleichmäßige ist, und daß bedeutende Unterschiede nicht nur von einer Tierart zur anderen, sondern auch bei derselben Tierart von einem Individuum zum anderen vorhanden sind, und selbst bei ein und demselben Individuum konstatiert man bedeutende Schwankungen des Katalasegehalts je nach den Bedingungen physiologischer oder pathologischer Natur.

Bei der Ubiquität dieses Ferments war es logisch, anzunehmen, daß die Katalase eine wichtige Rolle in den überall sich abspielenden

Prozessen spielen müsse, und, da man andererseits einen Zusammenhang zwischen der Oxybiose und dem Vorhandensein dieses Ferments konstatiert hatte, drängte sich selbstverständlich der Gedanke auf, daß es sich vorwiegend, vielleicht auch ausschließlich, um Oxydationsprozesse handeln müßte. Dieser Gedanke ist nun allgemein geworden, und fast alle Forscher stimmen darin überein, daß die Katalase ein notwendiges Glied in der Kette der sich bei der Oxydation abspielenden Prozesse darstellt, aber in welcher Weise die Katalase eingreift, ist ebenso unbekannt wie vorher.

Bis jetzt kennen wir keine einzige Reaktion der Katalase außer der H_2O_2-Zersetzung. Die Wirkung der Katalase ist streng spezifisch. Kein anderes Peroxyd, weder organisches noch anorganisches, wird von der Katalase angegriffen. Die Versuche, die wir mit sehr aktiven Katalasepräparaten angestellt haben (9, 15), ergaben negative Resultate; weder Oxydation noch Reduktion ist erzielt worden, keine Beeinflussung der Oxydations- oder der Reduktionswirkung in vitro ist verzeichnet worden.

In bezug auf die Wirkung in vivo (9, 10) haben wir zeigen können, daß Einführen sehr großer Katalasemengen in die Blutbahn von den Tieren sehr gut vertragen wird und zu keiner merkbaren Änderung des Stoff- und Energiewechsels führt. Die Katalase scheint als solche absolut wirkungslos ebensogut in vivo wie in vitro zu sein.

Andererseits haben wir (11) konstatiert, daß die direkt in die Blutbahn eingeführte Katalase ziemlich schnell aus dem Blute verschwindet, ohne in den Ausscheidungen (Harn usw.) zu erscheinen. Durch Abkühlung der Tiere kann das Verschwinden der Katalase aus der Blutbahn verzögert werden. Eine merkliche Anhäufung der Katalase in den verschiedenen Geweben haben wir nicht konstatieren können.

Nach Einführung von einer Katalasemenge, die um das Mehrfache den gesamten Katalasegehalt des Tieres übersteigt, fanden wir nach 30 Minuten einen nur geringen Teil im Blute bzw. Plasma wieder ($^1/_{10}$ bis $^1/_{20}$), und nach 2 Stunden ist sämtliche eingeführte Katalase aus der Blutbahn verschwunden (9).

Die Untersuchung der verschiedenen Gewebe auf ihren Katalasegehalt zeigt keine merkliche Steigerung desselben. Eine Ausscheidung durch die Nieren läßt sich nicht nachweisen. Im Harn findet man keine Spur von Katalase. Übrigens ändert sich das Bild durch Nephrektomie nicht im geringsten. Es scheint sich somit um eine Zerstörung oder Inaktivierung der eingeführten Katalase durch das Blut und die anderen Gewebe zu handeln.

Die Möglichkeit einer solchen Inaktivierung der Katalase durch die Gewebe ist von uns in vitro (12) nachgewiesen worden. In den wässerigen Gewebeauszügen konnten wir bereits bei Zimmertemperatur eine deutliche Abnahme des Katalasegehalts wahrnehmen. Bei Körpertemperatur ist diese Abnahme recht bedeutend und verläuft ziemlich schnell. In derselben Weise verschwindet auch die den Gewebeauszügen zugesetzte Katalase. Diese von uns gemachten Beobachtungen sind in neuester Zeit von unseren Moskauer Mitarbeitern, die diese Frage einem eingehenden Studium unterzogen haben, vollauf bestätigt worden. In ihren demnächst erscheinenden

Untersuchungen konnten *Belkina, Kremlew* und *Falk* zeigen, daß bereits nach 10 Minuten ein beträchtlicher Teil der eingeführten Katalase aus dem Blute verschwindet, und daß die nach dem Verbluten und nachfolgenden Durchspülen des Tieres untersuchten Gewebe nur einen kleinen Teil der Katalase adsorbiert zu haben scheinen. Unter allen daraufhin untersuchten Geweben zeigt die Niere die bedeutendste Steigerung ihres Katalasegehalts, die Leber und die Milz weisen eine weniger große Steigerung auf, und in den übrigen Geweben ist der Katalasegehalt normal. Werden die Gewebe erst längere Zeit nach der Katalaseeinspritzung untersucht, so findet man keine Steigerung ihres Katalasegehalts. Die in ihnen anfangs angehäufte Katalase scheint somit von ihnen völlig vernichtet zu sein. Ob es sich bei der im Anfang konstatierten Katalasevermehrung in einigen Geweben um eine einfache Adsorption der Katalase aus der Blutbahn handelt oder ob die Katalase in das Zellinnere eingedrungen, haben wir nicht näher untersucht. Das gleiche läßt sich von den Blutkörperchen sagen, die anfangs eine gewisse Steigerung ihres Katalasegehalts aufweisen und nach völligem Verschwinden der Katalase aus dem Plasma ihren normalen Katalasegehalt wiedergewinnen.

Die Abnahme der Katalase in den Gewebeauszügen ebenso wie das Verschwinden der Katalase in vivo ist von uns der Wirkung eines besonderen Körpers zugeschrieben worden. Diese Substanz, die wir in mehr oder weniger großer Menge im Blute und in den verschiedenen Geweben konstatieren konnten, haben wir als *Antikatalase* (12) bezeichnet. Über die Natur dieses Körpers läßt sich einstweilen nichts Bestimmtes aussagen. Die Fermentnatur ist nicht sichergestellt. Die Hitzeempfindlichkeit dieses Körpers ist sehr unbeständig und hängt wahrscheinlich von den die Antikatalase begleitenden Stoffen ab. Einige Präparate verlieren ihre Aktivität bereits nach Erwärmen auf 60°, während andere Präparate selbst bei Siedetemperatur keine Abschwächung erleiden. Die Bezeichnung Antikatalase bedeutet keineswegs, daß wir es hier mit einem Antiferment im Sinne der Immunitätslehre zu tun haben. Es soll nur bedeuten, daß es sich um einen Stoff handelt, der auf die Katalase eine hemmende Wirkung ausübt.

Die Wirkung der Antikatalase wird von der Temperatur und dem p_H der Lösung stark beeinflußt. Bei 0° wird die Katalase von der Antikatalase nicht angegriffen. Eine merkliche Wirkung tritt erst bei 10° auf und nimmt mit steigender Temperatur schnell zu. Das Optimum scheint bei 38 bis 40° zu liegen. Bei einem p_H unter 6 oder über 7 kommt die Wirkung der Antikatalase nicht zur Geltung. Das Optimum liegt bei $p_H = 6{,}25$ bis 6,50. Unter diesen optimalen Bedingungen ist der Reaktionsverlauf ein sehr schneller. Bereits nach einem Kontakt von 2 Minuten ist ein bedeutender Teil der Katalase inaktiviert, und zwar beträgt die Inaktivierung 20 bis 25 Proz., nach 5 Minuten 39 bis 35 Proz., nach 10 Minuten 45 bis 48 Proz., nach 15 Minuten 56 bis 60 Proz. und nach 30 Minuten ist das Maximum erreicht, d. h. die Inaktivierung beträgt 70 bis 75 Proz. Völlige Inaktivierung der Katalase durch die Antikatalase wird nie erzielt, wie groß auch die Antikatalasemenge und wie lang auch die Kontaktdauer sei. Daß es sich nicht um eine Vernichtung der Antikatalase selbst handelt, folgt aus dem Umstande, daß Zusatz neuer Katalasemengen die Reaktion wieder in Gang bringt, um wieder stillzustehen, sobald 70 bis 75 Proz. der zugesetzten Katalase inaktiviert worden sind. Es handelt sich also um ein Gleichgewicht zwischen aktiver und inaktivierter Katalase, das sich bei einem Verhältnis aktive Katalase : inaktivierte Katalase = 25 : 75 einstellt.



Gegenwart von Sauerstoff ist für die Reaktion unumgänglich, und zwar genügen bereits Spuren O_2; der Sauerstoff kann durch einen Wasserstoffakzeptor, wie Thionin oder Methylenblau, ersetzt werden. Bei der Einwirkung der Antikatalase auf die Katalase scheint es sich somit um einen *Oxydationsprozeß*, und zwar um einen reversiblen Oxydationsprozeß zu handeln.

In den Gewebeauszügen wird die inaktivierende Wirkung der Antikatalase durch einen besonderen Körper, die thermolabile Philokatalase (13) gehemmt, die auf diese Weise die Katalase gegen die Antikatalase schützt. Diese Schutzwirkung der Philokatalase wird durch wasserlösliche thermostabile, ebenfalls in den Geweben vorhandene Körper, die von uns als *Aktivator der Philokatalase* (13) bezeichnet worden, verstärkt. Beachtenswert ist die Tatsache, daß Zusatz von Philokatalase nicht nur die Wirkung der Antikatalase hemmt, sondern auch die bereits inaktivierte Katalase *in aktive umwandelt, also regeneriert.* Nach einer Kontaktdauer von 3 Minuten ist bereits eine Reaktivierung von mehr als 50 Proz. zu verzeichnen. Nach 5 Minuten beträgt die Reaktivierung 75 Proz. und nach 15 Minuten ist die Reaktivierung vollständig. Eine ähnliche Schutzwirkung wird durch Zusatz von Alkohol, Aldehyd und einigen anderen Körpern zum Reaktionsgemisch Katalase—Antikatalase erzielt. Im Gegensatz zur Philokatalase ist jedoch die Reaktivierung der inaktivierten Katalase nur gering und häufig überhaupt nicht zu verzeichnen. Bemerkenswert ist die Tatsache, daß es sich vorwiegend um Stoffe handelt, die im Tierorganismus durch besondere Fermente oxydiert werden können. Ebenso wie die Antikatalase ist die Philokatalase sowie deren Aktivator in den verschiedenen Geweben, allerdings in verschiedenen Mengenverhältnissen vorhanden. Diese Mengenverhältnisse, die den jeweiligen Katalasegehalt des Gewebes beeinflussen, werden von unseren Moskauer Mitarbeitern *Gagarina* und *Jankowsky* untersucht und werden demnächst veröffentlicht werden.

Die verschiedenen Gewebe enthalten also außer der Katalase, Antikatalase und Philokatalase sowie den Aktivator der letzteren. Diese Stoffe gehen leicht in die wässerigen Auszüge über, die somit stets ein Gemenge von Katalase, Antikatalase und Philokatalase in verschiedenen Proportionen darstellen. Um die einzelnen Komponenten dieses Komplexes getrennt zu erhalten, müssen gewisse Kunstgriffe angewandt werden. So kann man die Katalase durch wiederholte Alkoholfällung der wässerigen Gewebeauszüge von der sie begleitenden Antikatalase und Philokatalase befreien. Die Antikatalase wird durch Fällen der wässerigen Gewebeauszüge mit Essigsäure und Behandeln des Filtrats mit 0,2proz. Salzsäure bei niedriger Temperatur unter Sauerstoffdurchlüftung von der Katalase und der Philokatalase befreit. Hingegen ist es schwer, die sehr labile Philokatalase rein darzustellen, oder, vielmehr, sie von der sie begleitenden Katalase, Antikatalase und Aktivatoren zu befreien, ohne sie gleichzeitig zu vernichten. Man muß sich damit begnügen, auf indirekte Weise die in einem gegebenen Gewebe enthaltene Philokatalasemenge zu bestimmen, und zwar aus dem Vergleich der Wirkung des gegebenen Extrakts vor und nach der Zerstörung der darin enthaltenen Philokatalase. Der Aktivator der Philokatalase läßt sich leicht von der Katalase, Philokatalase und Antikatalase durch Erhitzen auf Siedetemperatur bei neutraler oder leicht alkalischer Reakton befreien.

Diese unsere Untersuchungen über die Antikatalase und die Philokatalase, die zum größten Teil bereits im Jahre 1905 veröffentlicht

worden sind, haben von seiten der verschiedenen Forscher, die sich mit dem Katalaseproblem beschäftigen, keine oder nur geringe Beachtung gefunden, und bei den Untersuchungen betreffend die Verteilung der Katalase in den verschiedenen Tierorganismen, sowie die Änderung des Katalasegehalts der Gewebe unter verschiedenen physiologischen und pathologischen Bedingungen, ist der Einfluß der Antikatalase nicht in Betracht gezogen worden. Es liegt auf der Hand, daß die unter diesen Bedingungen von den verschiedenen Forschern verzeichneten Katalasewerte einer Revision bedürfen. Eine solche Revision ist von unseren Moskauer Mitarbeitern [*Gagarina* und *Jankowski* (38a)] unternommen worden, die die Änderung des Katalasegehalts, sowie die Antikatalase und Philokatalasemenge in den Geweben unter verschiedenen physiologischen und pathologischen Bedingungen eingehend untersuchten. Bei der Diskussion über die Rolle der Katalase ist ebensowenig auf die Tatsache geachtet worden, daß die Katalase in allen daraufhin untersuchten Geweben von der Antikatalase und der Philokatalase begleitet ist, und daß folglich in den Tiergeweben die Katalase als ein Glied eines bestimmten Systems oder Komplexes erscheint.

Zur Illustrierung des eben Gesagten seien folgende, den noch unveröffentlichten Arbeiten von *Belkina*, *Kremlew* und *Falk* entnommene Versuche angeführt.

Das zu untersuchende Tier (Kaninchen) wird entblutet und mit physiologischer Kochsalzlösung durchspült. Die frisch herausgeschnittenen Gewebe werden mit Quarzsand bei niedriger Temperatur zerrieben, mit dem nötigen Volumen eisgekühlten Wassers versetzt und 30 Minuten lang verrührt, hierauf filtriert und auf die gewünschte Verdünnung gebracht. Jeder Gewebeauszug wird zuerst sofort und hierauf nach 20 Minuten langem Aufbewahren bei Körpertemperatur auf seinen Katalasegehalt geprüft.

Die folgende Tabelle enthält die Katalasewerte der verschiedenen Gewebe, ausgedrückt durch die Zahl von Kubikzentimetern des durch die Zersetzung des H_2O_2 entwickelten Sauerstoffs unter der Einwirkung von 1 g Gewebe im Laufe von 5 Minuten.

	Blut	Leber	Milz	Niere	Lunge	Hirn	Muskel	Herz
1. a) Frischer Auszug	2550	2090	468	2228	304	32	29,6	121,2
b) Im Thermostaten bewahrter Auszug	1545	1450	400	1340	224	27,6	25,6	82,7
2. a) Frischer Auszug	3180	1430	1000	2040	234	17	13,3	131,2
b) Im Thermostaten bewahrter Auszug	1305	1200	760	1400	164	15	11,2	116,8

Wir sehen aus diesen Versuchen, daß bei Nichtbeobachtung des Antikatalasefaktors, je nach den Versuchsbedingungen mehr oder

weniger bedeutende Schwankungen in den verzeichneten Katalasewerten möglich sind. Für das Blut kann der Unterschied mehr als 50 Proz. betragen, je nachdem man die Bestimmung des Katalasegehalts sofort nach der Entnahme ausführt oder die Lösung längere Zeit stehen läßt. Daß in all diesen Versuchen die Verminderung des Katalasegehalts auf Antikatalasewirkung zurückzuführen ist, folgt aus der Tatsache, daß Zusatz von geringen Mengen Alkohol (1 : 10000) diese Abschwächung völlig verhindert. Die von uns gemachte Beobachtung, daß die Katalase unter den in den Geweben existierenden Bedingungen beständig einer Inaktivierung durch Oxydation unter dem Einfluß der Antikatalase und einer Regeneration durch Reduktion unter dem Einfluß der Philokatalase unterliegt, legt die Annahme nahe, daß der Komplex Katalase—Antikatalase—Philokatalase ein besonderes Oxydationssystem darstellt, bei dem die Antikatalase als oxydierendes Agens, die Katalase als sauerstoffübertragendes und die Philokatalase als reduzierendes und vielleicht auch als ein die zu oxydierenden Substanzen lieferndes Agens funktionieren. Bis zu einem gewissen Grade könnte die Rolle der Katalase in diesem Oxydationssystem mit der Rolle des Hämoglobins verglichen werden. Eine gewisse Analogie könnte auch zwischen diesem Katalasesystem und dem Oxygenase-Peroxydasesystem von *Bach* und *Chodat* (2) angenommen werden, und zwar könnte man das unter dem Einfluß der Antikatalase entstehende reversible Oxydationsprodukt der Katalase, die Oxykatalase, mit der Oxygenase vergleichen, während die Philokatalase wie die Peroxydase fungieren würde. Allerdings haben wir unter der Einwirkung dieses Systems sich vollziehende Oxydationen bisher mit Sicherheit nicht feststellen können, und wir müssen also bis auf weiteres annehmen, daß das Katalasesystem einen wahrscheinlich sehr wichtigen Teil des Oxydationssystems der Gewebe darstellt, worin es die Rolle der Übertragung des Sauerstoffs und vielleicht auch die Aktivierung desselben übernimmt.

In diesem Zusammenhange verdient die von uns gemachte Beobachtung erwähnt zu werden, daß die Oxydation des Alkohols durch Pferdelebergewebe (Alkoholoxydase) durch Zusatz von Milz (Antikatalasegewebe) gesteigert wird.

Es bleibt nun die Frage offen, ob im lebenden Organismus die Funktion der Katalase in der Zersetzung von H_2O_2 besteht. Wie bereits erwähnt wurde, ist diese Funktion die einzige, die wir in vitro bei der Katalase mit Sicherheit nachweisen können. Eine negative Antwort muß zu dem Schluß führen, daß die einzige in vitro konstatierte Reaktion des Ferments nichts mit der Funktion desselben in vivo zu tun habe, eine Erscheinung, die in der Fermentlehre vereinzelt dastehen würde, denn bisher ist uns kein Ferment bekannt, dessen Reaktion in vitro

nicht einem in vivo verlaufenden Prozeß entsprechen würde. Eine positive Antwort zwingt andererseits zu der Annahme, daß das Substrat der Katalase, H_2O_2, im Organismus existieren muß bzw. gebildet werden muß.

Allerdings haben alle bisher gemachten Versuche, H_2O_2 in den lebenden Tiergeweben nachzuweisen, ein negatives Resultat ergaben. Doch schließt dies durchaus nicht die Möglichkeit einer H_2O_2-Bildung aus; es fragt sich nur, unter welchen Umständen H_2O_2 gebildet wird. Es ist wohl kaum nötig zu betonen, daß eine eventuelle Bildung von H_2O_2 nur im Laufe der Oxydationsprozesse stattfinden kann. Die Möglichkeit einer solchen H_2O_2-Entstehung begegnet keinen theoretischen Schwierigkeiten. Wir brauchen nur an die Arbeiten von *Traube* (49) und an die neueren Arbeiten von *Wieland* (53) zu erinnern. Ob dabei H_2O_2 als Endprodukt oder als Zwischenprodukt entsteht, ist für die uns hier interessierende Frage nicht von Belang.

Nimmt man nun die H_2O_2-Bildung bei den Oxydationsprozessen an und zieht nun in Betracht, daß das entstehende H_2O_2 unverzüglich zersetzt wird, so muß man a priori erwarten, daß die jeweilige Katalasemenge durch die Energie der vor sich gehenden Oxydationsprozesse bedingt werde. Demnach müßte man den größten Katalasegehalt bei denjenigen Tieren und in denjenigen Geweben finden, die die größte Atmungsenergie bzw. die größte Oxydationsintensität besitzen. Demnach müßten die Gewebe der Vögel z. B., die einen sehr hohen respiratorischen Gaswechsel aufweisen, besonders reich an Katalase sein. In Wirklichkeit liegt die Sache aber anders, wie man sich leicht aus unseren Untersuchungen (9, 15) überzeugen kann. So konstatiert man z. B. für die Gewebe des Sperlings folgendes: Das Blut enthält zehnmal weniger Katalase, die Leber fünfmal weniger und das Gehirn zehnmal weniger Katalase als die entsprechenden Gewebe des Frosches, und im Vergleich zum Meerschweinchen ist der Katalasegehalt des Blutes 80mal geringer, der der Leber achtmal, der der Milz siebenmal, der der Lunge zehnmal und der des Gehirns zweimal niedriger.

Wenn also einerseits das Vorhandensein der Katalase an oxybiotische Prozesse eng gebunden zu sein scheint, ist andererseits eine Proportionalität zwischen der Intensität der energieliefernden Oxydationsvorgänge und der Menge der bei den verschiedenen Tierarten vorhandenen Katalase keineswegs nachzuweisen.

Betrachten wir nun die quantitative Verteilung der Katalase in den verschiedenen Geweben eines gegebenen Individuums und vergleichen wir sie mit der Intensität der verschiedenen Oxydationsvorgänge in denselben Geweben.

In der folgenden Tabelle stellen wir den Katalasegehalt und die Atmungsintensität mehrerer Gewebe des Hundes zusammen (16, 17, 26).

Die hier angeführten Zahlen bezeichnen die relative *Katalasewirkung* und die relative *Atmungsenergie* der einzelnen Gewebe, wobei wir mit 100 die maximale Katalasewirkung und die maximale Oxydationswirkung des aktivsten Gewebes bezeichnen.

Gewebe	Katalasegehalt	Atmungsintensität
Leber	100	84
Niere	93	95
Muskel	1,4	100
Hirn	1,1	78
Milz	5	12
Lunge	8,3	13

Wie wir aus dieser Tabelle ersehen, ist der Katalasegehalt in den Muskeln und dem Hirn des Hundes sehr gering, trotzdem diese Gewebe einen sehr intensiven respiratorischen Gaswechsel, d. h. eine große Oxydationsenergie besitzen. So beträgt z. B. der Katalasegehalt der Leber ungefähr das 70fache des Katalasegehalts der Muskeln, während die Oxydationsenergie dieser beiden Gewebe die gleiche ist.

Ähnliches konstatieren wir, wenn wir die *Oxydonenwirkung* der Gewebe des Hundes (24, 25, 28) mit dem Katalasegehalt derselben Gewebe vergleichen, wie die folgende Tabelle zeigt.

Gewebe	Katalasegehalt	Succinoxydon	Phenylendiaminoxydon
Leber	100	100	75,5
Niere	93	79,5	55,5
Muskeln	1,4	91	80
Hirn	1,1	50	100
Milz	5	20,6	20
Lunge	8,3	17,7	20

Wir konstatieren hier, daß der Katalasegehalt des Hirns ungefähr 90mal kleiner ist als der Katalasegehalt der Leber, während die Oxydationsenergie dieses Gewebes (Phenylendiaminoxydon) diejenige der Leber übertrifft.

Vergleichen wir hingegen den Katalasegehalt mit der *Oxydasewirkungsfähigkeit*, so konstatieren wir einen gewissen Parallelismus, wie wir aus der folgenden Tabelle ersehen, wo der relative Katalasegehalt, die akzessorische Atmungsintensität (20) sowie die Alkoholoxydase (21) und die Urikoxydase (19) zusammengestellt sind.

Gewebe	Katalasegehalt	Akzessor. Atmung	Alkoholoxydase	Urikoxydase
Leber	100	100	100	100
Niere	93	70	60	18
Muskeln	1,4	—	—	—

Für die Gewebe des Pferdes erhalten wir folgende Werte:

Gewebe	Katalasegehalt	Akzessor. Atmung	Alkoholoxydase	Urikoxydase
Leber	100	100	100	100
Niere	16,6	69	16	56
Muskeln	1,6	—	—	12

Allerdings ist der Parallelismus zwischen der Intensität der hier angeführten Oxydasevorgänge und dem Katalasegehalt nur relativ, aber man darf nicht vergessen, daß weder die akzessorische Atmung, noch die hier angeführte Alkoholoxydase und Urikoxydase die Gesamtheit der auf Oxydasewirkung beruhenden Vorgänge in den Tiergeweben darstellen, ebensowenig, wie die Hauptatmung und das weiter oben angeführte Succinoxydon und das Phenylendiaminoxydon die Gesamtheit der Atmungsenergie erschöpfen. Aber im großen und ganzen ersieht man aus diesen Zusammenstellungen, daß bei einem gegebenen Tiere der größte Katalasegehalt in denjenigen Geweben zu finden ist, in denen die auf Oxydasewirkung beruhende akzessorische Atmung, sowie die Oxydation von Alkohol und Harnsäure am intensivsten sind. Bei fast allen daraufhin untersuchten Tieren sind die Leber und die Niere die an Katalase weitaus reichsten Gewebe. Bei nur wenigen Tieren weist das Blut einen höheren Katalasegehalt auf als diese Gewebe, z. B. die Natter, deren Blut dreimal soviel Katalase enthält als die Leber und siebenmal soviel als die Niere, das Kaninchen und der Mensch (9, 15).

Einen noch engeren Parallelismus konstatiert man zwischen dem Peroxydasegehalt der Gewebe (18) und ihrem Katalasegehalt, wie aus folgenden Tabellen, die die relativen Peroxydase- und Katalasewerte einiger Gewebe des Hundes enthält, ersichtlich ist.

Gewebe	Katalasegehalt	Peroxydasegehalt
Leber	100	100
Niere	93	54
Muskeln	1,4	22
Gehirn	1,1	20
Lunge	8,3	33
Blut	8,2	71

Für die Gewebe des Pferdes konstatieren wir folgende Werte:

Gewebe	Katalasegehalt	Peroxydasegehalt
Leber	100	100
Niere	16,6	57
Milz	3	39
Blut	7	44,5

Bei der Beurteilung dieser Werte dürfen wir nicht außer acht lassen, daß Peroxydasewirkung teilweise auch durch das Hämoglobin vorgetäuscht werden kann und, da es sich in diesen Versuchen um nichtausgewaschene Gewebe handelt, muß ein Teil der Peroxydasewirkung natürlich auf das an den Geweben haftende Blut zurückgeführt werden.

Eine direkte Proportionalität zwischen Peroxydasewirkung und Katalasegehalt ist nicht festzustellen, ebensowenig wie zwischen Katalasegehalt und Oxydasewirkungsfähigkeit, aber hier wie dort konstatiert man die Tatsache, daß bei einem gegebenen Tiere die intensivste Peroxydasewirkung in den Geweben verzeichnet wird, die den größten Katalasegehalt aufweisen, während die Katalase nur in geringfügiger Menge in den Geweben vorhanden ist, in denen keine oder nur geringe Peroxydasewirkung nachgewiesen werden kann.

Der gleiche Zusammenhang wie zwischen Peroxydase und Oxydasewirkung einerseits und Katalasegehalt andererseits läßt sich auch für den Antikatalasegehalt der Gewebe verzeichnen. Die Antikatalase existiert ebenfalls hauptsächlich in den Geweben, in denen *Oxydase*- bzw. *Peroxydase*prozesse vor sich gehen, während die Gewebe, in denen die Oxydationsvorgänge hauptsächlich auf *Oxydonwirkung* beruhen, keine oder nur unbedeutende Mengen Antikatalase aufweisen.

Ob das Katalasesystem als ein besonderes Oxydationssystem fungiert oder einen notwendigen Teil des *Oxydasesystems* darstellt, kann auf Grund der hier angeführten Daten natürlich nicht entschieden werden. Das eine scheint aber mit zwingender Notwendigkeit hervorzugehen, nämlich, daß in den Tiergeweben die Katalasewirkung (bzw. das Katalasesystem) mit der *Oxydase*wirkung in Zusammenhang steht, während die *Oxydon*wirkung völlig unabhängig von dem Katalasesystem ist. Es scheint somit ein Zusammenhang zu bestehen zwischen dem Katalasesystem und der *Art* der Oxydationsprozesse, gleichgültig, in welcher Weise die Funktion der Katalase, richtiger des Katalasesystems, gedeutet wird. Die bisher von den verschiedenen Forschern postulierte Rolle der Katalase im Oxydationsprozeß muß also in der Weise modifiziert werden, daß an Stelle der *Oxydationsprozesse* im allgemeinen die *Oxydaseprozesse* gestellt werden.

Diese Beschränkung des Begriffs der Katalasefunktion ist nicht nur für die Deutung der Rolle des Katalasesystems wichtig, sondern auch für die Theorie der biologischen Oxydationsvorgänge, indem dadurch der Unterschied zwischen *Oxydon*- und *Oxydase*wirkung in ein neues Licht gerückt wird.

Bekanntlich waren wir im Laufe unserer Untersuchungen über den Mechanismus der Verbrennungen in den Tiergeweben zu der Annahme gelangt, daß es zwei Atmungsprozesse gibt: Die *Hauptatmung*,

die durch Oxydone bewirkt wird, und die *akzessorische* Atmung, die sich in der gleichen Weise verhält wie die bekannten Oxydasen (Alkoholoxydase, Urikoxydase und andere). In bezug auf die Rolle der Oxydone und der Oxydasen bei der Energieentwicklung in den *höheren* Tierorganismen, hatten wir die Behauptung aufgestellt, daß die Hauptrolle die Oxydone spielen, während die Oxydasen in dieser Beziehung nur eine untergeordnete Bedeutung besitzen und hauptsächlich eine Schutzwirkung ausüben. Bei den *niederen* Organismen hingegen stellt die Oxydasewirkung eine wichtige und in manchen Fällen die wichtigste Energiequelle vor (30, 31, 43).

Die wichtigsten Unterscheidungsmerkmale zwischen den Oxydasen und den Oxydonen beruhen zum größten Teil auf der komplexen Eiweißnatur der letzteren. Hierher gehört die Zerstörung der Oxydone durch Trypsin, durch die indifferenten Anaesthetica (Alkohol, Aceton usw.) und durch höhere Temperaturen, während die Oxydasen unter denselben Bedingungen nicht beeinflußt werden (27, 29, 32). Zu diesen Unterscheidungsmerkmalen, die sich nur auf die physikalisch-chemischen Eigenschaften beziehen, gesellt sich nun ein sehr wichtiger Unterschied und zwar im Wirkungsmechanismus dieser Katalysatoren.

Wir wollen hier nicht auf die verschiedenen Theorien und Hypothesen eingehen, die zur Erklärung der biologischen Oxydationsprozesse aufgestellt sind, und die im Grunde sich alle auf die von *Traube* (49) und von *Hoppe-Seyler* (40, 41) vertretenen Ansichten zurückführen lassen. Erwähnt seien hier nur die gleichzeitig von *Bach* (1) und von *Engler* (36) aufgestellte Peroxydtheorie und das auf ihr aufgebaute Oxygenase—Peroxydasesystem von *Bach* und *Chodat* (2), sowie die sich scheinbar schroff gegenüberstehenden Theorien der Sauerstoffaktivierung, wie sie hauptsächlich von *Warburg* (50, 51, 52) ausgebaut ist, und der Wasserstoffaktivierung, die in den letzten Jahren von *Wieland* (53) entwickelt worden und in den Untersuchungen von *Thunberg* (46, 47, 48), *Hopkins* und ihren Mitarbeitern eine wichtige Stütze gefunden hat.

Unsererseits (33, 35, 44) haben wir eine Oxydationstheorie aufgestellt, die im wesentlichen sich auf die von *Traube* gemachte Annahme stützt, daß die langsame Verbrennung nicht durch direkte Spaltung des molekularen Sauerstoffs, sondern durch Spaltung des Wassers erfolge, wobei als Zwischenprodukt H_2O_2 auftritt. Nach dem klassischen Schema der Autoxydation des Zinks würde der Prozeß so verlaufen:

$$Zn + \begin{array}{c} HOH \\ HOH \end{array} + \begin{array}{c} O \\ \| \\ O \end{array} = Zn\begin{array}{l} \diagup OH \\ \diagdown OH \end{array} + \begin{array}{c} HO \\ | \\ HO \end{array} \qquad (1)$$

$$Zn + \begin{array}{c} OH \\ | \\ OH \end{array} = Zn\begin{array}{l} \diagup OH \\ \diagdown OH \end{array} . \qquad (2)$$

Auch bei der Fermentwirkung im allgemeinen und bei den oxydoreduzierenden Fermenten im besonderen handelt es sich nach *Traube*

um Spaltung des Wassers in H und OH und um Übertragung des OH auf die zu oxydierende Substanz und gleichzeitige Übertragung des H auf die zu reduzierende Substanz.

Nach der von *Bach* (6, 7) aufgestellten Theorie entsteht unter dem Einfluß der oxydoreduzierenden Fermente aus dem Wasser einerseits das oxydierende Hydroperoxydhydrat $\begin{matrix}H\\H\end{matrix}\,O\,\begin{matrix}OH\\OH\end{matrix}$ und andererseits das reduzierende Oxyperhydrid $\begin{matrix}H\\H\end{matrix}\,O\,\begin{matrix}H\\H\end{matrix}$.

Nach unserer Auffassung handelt es sich bei allen Fermentprozessen um die Übertragung der von ihrer elektrischen Ladung befreiten Spaltungsprodukte des Wassers auf das Substrat, wobei natürlich durch die aktiven OH-Gruppen eine Oxydation und gleichzeitig durch die aktiven H-Gruppen eine Reduktion bewirkt wird. Nach dieser Auffassung würde ein prinzipieller Unterschied zwischen den hydrolytischen, hydrierenden und oxydoreduzierenden Fermenten nicht bestehen. Der Wirkungsmechanismus ist grundsätzlich der gleiche.

Die Rolle der Fermente besteht somit in der Entladung der H^+- und OH^--Ionen des Wassers und in der Übertragung der aktiven H- und OH-Gruppen auf das Substrat, wobei es gleichgültig ist, ob die beiden Spaltprodukte des Wassers auf ein und dasselbe Molekül übertragen werden, oder auf zwei gleiche Moleküle oder auf zwei verschiedene Moleküle.

Im ersten Falle kann die gleichzeitige Fixierung der beiden Spaltprodukte des Wassers zu einer Spaltung des Substrats führen, wie es bei den gewöhnlichen Hydrolysen der Fall ist, oder aber die Spaltung bleibt aus und man spricht dann von Hydratation, wie z. B. die Umwandlung der Fumarsäure in Äpfelsäure durch die Fumarase (34)

$$\begin{matrix}COOH{-}CH{=}CH{-}COOH\\ +\ H{-}OH\end{matrix} = COOH{-}CH_2{-}CHOH{-}COOH.$$

Als Beispiel des zweiten Falles können wir die Aldehydasewirkung anführen. Z. B. die Umsetzung des Acetaldehyds zu Essigsäure und Äthylalkohol unter dem Einfluß der Aldehydase:

$$\begin{matrix}R{-}C{\lesssim}^{O}_{H} + {}^{O}_{H}{\gtrsim}C{-}R\\ +\begin{matrix}H-OH\\H-OH\end{matrix}\end{matrix} = R{-}\overset{H}{\underset{\diagdown H}{C}}OH + R{-}C{\lesssim}^{O}_{OH} + HOH$$

Im dritten Falle spricht man von Reduktion, wenn man das Hauptgewicht auf das durch die H-Wirkung entstandene Reduktionsprodukt legt, oder von Oxydation, wenn man das durch die OH-Wirkung entstandenen Oxydationsprodukt im Auge hat, oder auch von Oxydoreduktion. So kann man z. B. bei der Umwandlung von Alkohol zu Essigsäure unter dem Einfluß der Alkoholoxydase in Gegenwart von Methylenblau oder von Nitraten von der Oxydation des Alkohols, oder auch von der Reduktion des Methylenblaus und der Nitrate sprechen.



Die Spezifität der Fermente wird entweder durch die OH-übertragende Gruppe oder durch die H-übertragende Gruppe oder durch die beiden Gruppen des Ferments bedingt.

Kehren wir nun zu den Oxydationsprozessen zurück. Hier können folgende Fälle in Betracht kommen:

1. Das Oxydationsferment, oder, allgemeiner gesprochen, der Oxydationskatalysator, ist nur in seinem OH-übertragenden Teile spezifisch, während die H-übertragende Gruppe auf jeden beliebigen Wasserstoffakzeptor wirken kann, wie z. B. Methylenblau und andere leucobasenliefernde Farbstoffe, Nitrate usw., sowie molekularer Sauerstoff, der sich mit dem aktiven Wasserstoff zu H_2O_2 verbindet. In dieser Weise funktionieren die typischen Oxydationsfermente, wie die Alkoholoxydase, die Urikoxydase und die Polyphenoloxydasen, die in Gegenwart von Methylenblau das entsprechende Substrat oxydieren und gleichzeitig das Methylenblau reduzieren, während in Gegenwart von Sauerstoff eine der Oxydation entsprechende Menge Sauerstoff verbraucht wird.

2. Der Oxydationskatalysator ist nicht nur in seinem OH-übertragenden, sondern auch in seinem H-übertragenden Teile spezifisch, und zwar in der Weise, daß die H-übertragende Gruppe nur mit Sauerstoff, und zwar mit aktiviertem, in bestimmter Weise gebundenem Sauerstoff reagieren kann.

In dieser Weise funktionieren die Oxydone. Bei der Oxydation des entsprechenden Substrats, z. B. Bernsteinsäure, Citronensäure usw., durch die Oxydone, entsteht kein H_2O_2, da hier aktiver Wasserstoff mit aktivem Sauerstoff reagiert und direkt Wasser gebildet wird. Die Aktivierung des Sauerstoffs kann in diesen Fällen durch Stoffe, wie z. B. das Eisen, bewirkt sein.

Die Oxydationsprozesse des ersten Typus, die wir kurzweg als *Oxydaseprozesse* bezeichnen wollen, sind also dadurch charakterisiert, daß aktivierter Wasserstoff mit molekularem, als Wasserstoffakzeptor fungierendem Sauerstoff reagiert, wobei H_2O_2 entsteht.

Eine Anhäufung des für das Protoplasma sehr giftigen H_2O_2 kommt nicht zustande, da es durch die in den Zellen anwesende Katalase sofort zersetzt wird, eventuell auch von gleichzeitig anwesenden Peroxydasen zu weiteren Oxydationszwecken benutzt wird.

Daß der Sauerstoff durch andere Wasserstoffakzeptoren ersetzt werden kann, ist bereits erwähnt worden.

Die Oxydationsprozesse des zweiten Typus, die wir der Kürze halber als *Oxydonenprozesse* bezeichnen wollen, sind dadurch gekennzeichnet, daß aktivierter Wasserstoff mit aktiviertem Sauerstoff reagiert. Zu einer Bildung von H_2O_2 kommt es hierbei nicht.

Wir haben es somit in den aerob lebenden Tierorganismen mit zwei verschiedenen Oxydationssystemen zu tun: 1. das *Oxydasesystem*, das zu seiner normalen Auswirkung in den Tiergeweben die Mithilfe des Katalasesystems verlangt, und 2. das *Oxydonensystem*, das vom Katalasesystem unabhängig ist.

Es ist beachtenswert, daß diese beiden Oxydationssysteme nicht nur in der Tierreihe ungleichmäßig verteilt sind, sondern daß auch in den verschiedenen Geweben ein verschiedenes Verhältnis der beiden Oxydationssysteme zueinander konstatiert werden kann.

Bei den niederen Tierarten wiegt das Oxydasesystem vor, wie wir es z. B. bei den Insekten zeigen konnten (30, 31), wo, bei den Larven namentlich, der respiratorische Gaswechsel zum größten Teil auf Oxydasewirkung beruht und der Gehalt an Oxydasen, wie z. B. die Tyrosinoxydasen und die Polyphenoloxydasen unvergleichlich höher ist, als bei den höheren Tieren. Bei diesen niedrigeren Tieren bilden die Oxydaseprozesse die weitaus wichtigste Energiequelle.

Bei den höheren Tieren hingegen (Wirbeltiere) wiegt das Oxydonsystem vor, und der weitaus größte Teil des respiratorischen Gaswechsels ist hier auf Oxydonenwirkung zu beziehen. Bei diesen Tieren sind es also die Oxydonenprozesse, die die Hauptquelle der Energie darstellen.

Betrachten wir nun die einzelnen Gewebe, so finden wir, daß einige Gewebe, wie z. B. die Leber und die Niere, neben dem Oxydonensystem ein gut ausgesprochenes Oxydasesystem besitzen, daß hingegen in einigen anderen Geweben, wie z. B. den Muskeln, das Oxydasesystem kaum nachgewiesen werden kann, während die Oxydonenprozesse dort sehr intensiv sind. Der Energieumsatz vollzieht sich also in diesen Geweben ausschließlich auf Kosten der Oxydone. Das Katalasesystem scheint denselben Gesetzen zu gehorchen und herrscht da vor, wo die Oxydaseprozesse am intensivsten sind.

Phylogenetisch wäre der Oxydonenprozeß als ein später erworbener Oxydationsmechanismus zu betrachten, der allmählich das Oxydasesystem in den energieliefernden Prozessen ersetzt und in manchen Geweben die ganze Energielieferung übernommen hat. Als phylogenetisch älteren und deshalb allgemeineren Mechanismus sind die auch in Sauerstoffabwesenheit vor sich gehenden hydrolytischen und glykolytischen Prozesse zu betrachten, die für den geringen Energieaufwand der niedrigsten aerob lebenden Organismen völlig ausreichen. Hier fehlt auch das Katalasesystem. Mit dem Auftreten aerob lebender Organismen entwickelt sich das Oxydasesystem und gleichzeitig entwickelt sich auch als notwendiger Teil desselben das Katalasesystem. Schließlich mit der steigenden Komplikation der Lebensbedingungen, die einen immer größeren Aufwand von Energie erfordern, entwickelt sich das Oxydonensystem, das in den Organen, die man gemeinhin unter dem

Namen animalisches System zusammenfaßt, wie die quergestreiften Muskeln und das cerebrospinale Nervensystem, fast die ganze Energielieferung übernimmt, während das Oxydasesystem nur eine untergeordnete Rolle in dieser Beziehung spielt und hauptsächlich als Schutzwirkung in Betracht kommt. Daß das Katalasesystem in den Oxydonenprozessen keine Rolle spielt, geht aus dem sehr niedrigen Katalasegehalt dieser Organe deutlich hervor.

Es unterliegt keinem Zweifel, daß in den Oxydaseprozessen das Katalasesystem eine entscheidende Rolle spielt, aber es muß vorderhand unentschieden bleiben, ob die Funktion der Katalase darin besteht, die Zusetzung des bei diesen Oxydationsprozessen entstehenden H_2O_2 zu bewirken und eventuell durch Übertragung des entwickelten Sauerstoffs die weitere Oxydation zu fördern, oder ob es sich um ein besonderes, auf bestimmte bei diesen Oxydationsvorgängen entstehende Stoffe eingestelltes Oxydationssystem handelt.

Die Rolle der Antikatalase und der Philokatalase würde demnach darin bestehen, die Wirkung der Katalase auf das entstehende H_2O_2 zu regeln, sie den jeweilig zu zersetzenden H_2O_2-Menge nanpassend, und andererseits die Übertragung des Sauerstoffs durch die Katalase zu ermöglichen und auf diese Weise die Oxydationsprozesse zu fördern. Interessant ist in diesem Zusammenhange auch die Tatsache, daß in seinen aktivsten Katalasepräparaten *Hennichs* (39) einen Eisengehalt von 3,3 bis 4,1 Proz. konstatiert hat.

Zusammenfassung.

1. Die Katalase bildet zusammen mit der Antikatalase, der Philokatalase und dem Aktivator der Philokatalase ein System, das wir der Kürze halber als *Katalasesystem* bezeichnen.

2. Das Katalasesystem ist nur bei den aerob lebenden Organismen entwickelt, steht aber mit der Intensität der Oxydationsvorgänge im allgemeinen in keinem direkten Verhältnis.

3. Es besteht ein gewisser Zusammenhang zwischen dem Katalasesystem und der Art der Oxydationsprozesse: das Katalasesystem existiert überall da, wo Oxydaseprozesse vor sich gehen, und fehlt da, wo nur Oxydonenwirkung verzeichnet wird.

4. Die Oxydone unterscheiden sich von den Oxydasen unter anderem dadurch, daß bei der Oxydasewirkung H_2O_2 durch die Reaktion zwischen aktivem Wasserstoff und molekularem Sauerstoff entsteht, während bei der Oxydonenwirkung infolge der Reaktion zwischen aktivem Wasserstoff und aktiviertem Sauerstoff direkt Wasser entsteht.

5. Die Rolle des Katalasesystems besteht in der Zersetzung des entstehenden H_2O_2 und eventuell in der Förderung der Oxydationsprozesse durch Übertragung des Sauerstoffs.



Literatur.

1) *A. Bach*, C. r. de l'Acad. de Sciences **124**, 951, 1897; Moniteur Scientifique **4**, 2, 479, 1897. — 2) *A. Bach* und *C. Chodat*, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **35**, 2466, 1902; **36**, 600, 1903; **37**, 1342, 1904. — 3) *A. Bach*, Fortschritte der naturw. Forschung **1**, 85, 1910. — 4) *Derselbe*, diese Zeitschr. **31**, 443, 1911. — 5) *Derselbe*, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **46**, 3864, 1913. — 6) *Derselbe*, Arch. d. Sciences physiques et natur. général **37**, 409, 1914. — 7) *Derselbe*, ebendaselbst **39**, 59, 1915. — 8) *Derselbe*, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **58**, 1388, 1925. — 9) *F. Battelli* et *L. Stern*, Archivio di Fisiologia **2**, 471, 1905. — 10) *Dieselben*, Soc. de Biol. **57**, 46, 1904. — 11) *Dieselben*, ebendaselbst **57**, 405, 1904. — 12) *Dieselben*, Journ. de Physiol. et de Pathol. générale **7**, 919, 1905. — 13) *Dieselben*, ebendaselbst **7**, 957, 1905. — 14) *Dieselben*, diese Zeitschr. **10**, 275, 1908. — 15) *Dieselben*, Die Katalase (Zusammenfassung), Ergebn. d. Physiol. **10**, 531, 1910. — 16) *Dieselben*, Journ. de Physiol. et de Pathol. générale **9**, 410, 1907. — 17) *Dieselben*, ebendaselbst **9**, 737, 1907; Arch. intern. de Physiol. **5**, 275, 1907. — 18) *Dieselben*, diese Zeitschr. **13**, 44, 1908. — 19) *Dieselben*, ebendaselbst **19**, 219, 1909. — 20) *Dieselben*, ebendaselbst **21**, 487, 1909. — 21) *Dieselben*, ebendaselbst **28**, 145, 1910. — 22) *Dieselben*, ebendaselbst **29**, 145, 1910. — 23) *Dieselben*, Die Oxydationsfermente (Zusammenfassung), Ergebn. d. Physiol. **12**, 96, 1912. — 24) *Dieselben*, diese Zeitschr. **30**, 172, 1910. — 25) *Dieselben*, ebendaselbst **31**, 263, 1911. — 26) *Dieselben*, ebendaselbst **33**, 315, 1911. — 27) *Dieselben*, ebendaselbst **34**, 263, 1911. — 28) *Dieselben*, ebendaselbst **46**, 317, 1912. — 29) *Dieselben*, ebendaselbst **52**, 226, 1913. — 30) *Dieselben*, ebendaselbst **56**, 35, 1913. — 31) *Dieselben*, ebendaselbst **56**, 63, 1913. — 32) *Dieselben*, ebendaselbst **63**, 363, 1914. — 33) *Dieselben*, Soc. de. Biol. **83**, 1544, 1920. — 34) *Dieselben*, ebendaselbst **84**, 305, 1921. — 35) *Dieselben*, Arch. intern. de Physiol. **18**, 403, 1921. — 36) *C. Engler* und *Wild*, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **30**, 1669, 1897. — 37) *C. Engler* und *Weissberg*, Kritische Studien über die Vorgänge der Autoxydation. Braunschweig 1904. — 38) *C. Engler* und *Herzog*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **59**, 327, 1909. — 38a) *E. Gagarina* und *W. Jankowsky*, Journ. f. exper. Biol. u. Med. **7**, 33, 1926. — 39) *S. Hennichs*, diese Zeitschr. **171**, 314, 1926. — 40) *F. Hoppe-Seyler*, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **16**, 117, 1883. — 41) *Derselbe*, ebendaselbst **16**, 1917, 1883. — 42) *O. Loew*, U. S. Depart. of Agric. Report **68**, 1901. — 43) *L. Stern*, Berl. klin. Wochenschr. 1914, S. 22. — 44) *L. Stern* et *F. Battelli*, Intern. Physiologenkongreß, Edinburg 1923. — 45) *Dieselben*, ebendaselbst, Stockholm 1926. — 46) *T. Thunberg*, Skand. Arch. f. Physiol. **35**, 163, 1918. — 47) *Derselbe*, ebendaselbst **40**, 1, 1920. — 48) *Derselbe*, Arch. néerland. de Physiol. **7**, 240, 1922. — 49) *M. Traube*, Gesammelte Abhandlungen, Berlin 1899; 1858, S. 59; 1878, S. 386; 1882, S. 396; 1883, S. 445; 1893, S. 570. — 50) *O. Warburg*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **92**, 231, 1914. — 51) *Derselbe*, diese Zeitschr. **142**, 518, 1923. — 52) *Derselbe*, ebendaselbst **152**, 479, 1924. — 53) *H. Wieland*, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **45**, 2606, 1912; **46**, 3327, 1913; **47**, 2085, 1914; **54**, 2353, 1921; Liebigs Ann. d. Chem. **431**, 301; **436**, 185 und 229; **439**, 126; **445**, 198. — (Zusammenfassung) Ergebn. d. Physiol. **20**, 474, 1922.

Zur Kenntnis der Oxydationsvorgänge in der lebenden Zelle.

Von

A. Oparin.

(Aus dem botanischen Institut der Universität Moskau.)

(Eingegangen am 17. Januar 1927.)

Mit 5 Abbildungen im Text.

I. Einleitung.

Es ist schon seit langem bekannt, daß der Atmungsprozeß bei der Zerstörung der Zellstruktur erhebliche Störungen erleidet und sogar vollends zum Stillstand kommt.

Claude Bernard hat in seinen „Vorlesungen über die Lebenserscheinungen" (1870) mit großer Bestimmtheit auf das Aufhören der Atmung nach mechanischer Zerstörung der Zelle hingewiesen. Spätere Untersuchungen an pflanzlichen sowohl als an tierischen Objekten bestätigten diese Erscheinung in vollem Maße. Dabei wurde festgestellt, daß durch die Vernichtung der Zellstruktur am stärksten der Vorgang der Sauerstoffaufnahme, der aerobe Oxydationsprozeß, beeinträchtigt wird. *S. Kostytschew* (1) hat in seinen Untersuchungen über die Atmung der Pflanzen die Beobachtung gemacht, daß durch Erfrierenlassen getötete Keimlinge und Samen zwar Kohlensäure ausscheiden, aber für jedes Äquivalent Kohlensäure ein Äquivalent Alkohol bilden. Dieses Verhältnis bleibt konstant, gleichviel, ob die Objekte von Luft oder von Wasserstoff umgeben sind. Lebende Samen und Keimlinge nehmen hingegen Sauerstoff aus der Luft auf und bilden nur äußerst geringe Mengen Alkohol. *Zalesky* und *Reinhard* (2) gelangten auf Grund ihrer Untersuchungen an Erbsensamen ebenfalls zu der Überzeugung, daß die Kohlensäure, die zu Mehl zerriebene Samen ausscheiden, ausschließlich anaeroben Ursprungs ist, während die aeroben Vorgänge unter diesen Bedingungen stark herabgesetzt sind oder sogar vollständig aufhören. Zu ähnlichen Folgerungen kamen auch *L. Iwanoff* (3) und späterhin *I. Bodnar* und *P. Hoffner* (4).

Aus obigen Arbeiten geht mit Bestimmtheit hervor, daß die Prozesse anaerober, oxydoreduktiver Art bei der Vernichtung der Zellstruktur fast unbeeinträchtigt bleiben, ja unter Umständen sogar an Intensität zunehmen (5). Die mit Aufnahme von Sauerstoff aus der Luft vor sich gehenden Prozesse gelangen hingegen dabei zum völligen Stillstand. Diese Beobachtungen rechtfertigten die Folgerung, daß die Oxydation der Bestandteile der Zelle durch den molekularen Sauer-

stoff auf irgend eine Weise von der Existenz einer bestimmten, dem lebenden Zellprotoplasma eigenen Struktur abhängen. Diese Folgerung wurde derzeit von mehreren Autoren gezogen und verschiedenen Theorien der Atmung zugrunde gelegt; dies gilt auch für die von *O. Warburg* in neuerer Zeit aufgestellte Theorie, die großes Aufsehen erregt hat.

Auf Grund seiner Untersuchung an den Erythrocyten von Vögeln kam *O. Warburg* (6) zu der Überzeugung, daß bei den vitalen Oxydationserscheinungen eine sehr wichtige Rolle der Adsorption der oxydationsfähigen Substanzen an den Oberflächen intrazellularer Strukturen zukommt. Bekanntlich wird Knallgas an der Oberfläche poröser Körper zu Wasser umgewandelt. Ganz ähnlich können nach *Warburg* in der lebenden Zelle verschiedene organische Stoffe durch gasförmigen Sauerstoff an aktiven Zelloberflächen oxydiert werden. Bei der Einwirkung von Narkoticis auf die lebende Zelle wird bekanntlich die Atmung aufgehoben. Dies hänge davon ab, daß die Narkotica als stark oberflächenaktive Stoffe die der Oxydation unterliegenden Verbindungen aus der Oberfläche der Zellstruktur verdrängen und selbst an ihre Stelle treten (7).

Späterhin hat *Warburg* (8) diese Auffassung etwas komplizierter gestaltet und den Begriff der chemischen Aktivierung des Sauerstoffs durch Eisen in den Vordergrund gerückt. Laut der gegenwärtigen Anschauung *Warburgs* „sind also alle an dem Vorgang der Atmung beteiligten Moleküle aktiviert, der Sauerstoff durch chemische Kräfte, die übrigen Moleküle durch unspezifische Oberflächenkräfte“ (9).

Zur Bestätigung seiner Theorie konstruierte *Warburg* sein bekanntes Kohlemodell, mit Hilfe dessen er eine Reihe von Aminosäuren durch den Sauerstoff der Luft oxydierte. Der Zusatz verschiedener Narkotica zu dem Reaktionsgemisch brachte den Oxydationsprozeß zum Stillstand. Dabei konnte eine verhältnismäßig einfache Abhängigkeit der Wirkungsstärke des Narkoticums von seiner Adsorptionskonstante festgestellt werden. Das Narkoticum wirkte um so stärker, je größere Oberflächenaktivität es besaß.

Es unterliegt kaum einem Zweifel, daß die Oberflächenkräfte im Kohlemodell eine sehr bedeutende Rolle spielen. Fraglich ist aber, ob die sich in diesem Modell vollziehenden Prozesse mit den in der lebenden Zelle verlaufenden analog sind.

Der wesentliche Nachteil des *Warburg*schen Modells besteht darin, daß es aus Materialien aufgebaut ist, die der lebenden Zelle fremd sind. *Warburg* gibt dies selbst zu. Bei der Beschreibung des Fructose-Phosphatsystems bemerkt er: „Die große Bedeutung des Systems Fructose-Phosphat-Eisen liegt darin, daß es ausschließlich aus Substanzen aufgebaut ist, die in der Zelle vorkommen ... In dieser Beziehung ist das System ein besseres Modell als das Kohlemodell, in dem die Bindung des Eisens unphysiologisch ist (10).

Zur Herstellung des Kohlemodells aus Hämoglobin, muß diese natürliche Verbindung, die an und für sich allen Anforderungen der

*Warburg*schen Theorie (Eisen- und Stickstoffgehalt usw.) entspricht, zu Kohle verbrannt, d. h. zu einem der lebenden Zelle vollständig fremden Stoff verwandelt werden.

Schon dieser Umstand läßt die Frage entstehen, ob das Kohlemodell wirklich eine echte „innere Homologie" (11) oder nur eine mehr oder weniger entfernte Analogie mit den vitalen Oxydationen darstellt. Bedenken erweckt weiter die *Warburg*sche Interpretation der Wirkung der Narkotica auf den Atmungsprozeß. Seiner Ansicht nach verdrängen die Narkotica die zur Oxydation bestimmten Substanzen aus der Oberfläche der Zellstrukturen. Dementsprechend sollten die Narkotica auf den Atmungsprozeß nur in einer Richtung, und zwar hemmend einwirken. Dem ist aber *nicht* so. Durch eine Reihe von Autoren (12) ist nachgewiesen worden, daß die Atmung bei geringer Narkose nicht herabgesetzt, sondern sogar beträchtlich gesteigert wird und eine längere Zeit in erhöhtem Zustande verbleiben kann. Stärkere Dosen des Narkoticums bewirken eine Abnahme der Atmung, aber dieser Abnahme geht fast stets eine Steigerung des Atmungsprozesses voraus (13). Diese Erscheinung ist mit den Anschauungen *Warburgs* nicht gut vereinbar.

Desgleichen läßt sich auch das Phänomen der „Stimulierung" der Atmung durch mechanische Schädigung nicht in den Rahmen dieser Theorie zwängen. Bei der Zerstörung der Zellstruktur tritt zuerst eine beträchtliche Erhöhung der Intensität der Oxydationsvorgänge auf, und dann erst beginnt die mehr oder weniger rasche Abnahme der Atmungsintensität (14). Schließlich gibt die *Warburg*sche Theorie auch keinen Anhaltspunkt für die Deutung der bekannten Abnahme der Atmung der Pflanzen bei Erhöhung des Partialdrucks des Sauerstoffs. In reinem Sauerstoff und insbesondere bei Überdruck fangen die Pflanzen erst an, sehr intensiv zu atmen, dann sinkt aber die Atmung und die Pflanzen gehen zugrunde. Das Gesamtbild der Erscheinung ist das gleiche wie bei der Vergiftung mit narkotischen Substanzen oder bei der mechanischen Schädigung (15).

Alle erwähnten Erscheinungen der sogenannten „Stimulierung" der Atmung bleiben vom Standpunkt der Adsorptionstheorie *Warburgs* unverständlich. Die *Warburg*sche Atmungstheorie scheint also keinen Anspruch auf allgemeine Gültigkeit erheben zu können.

Wie im nachstehenden erörtert wird, läßt sich *auf Grund experimentell festgestellter Tatsachen aus isolierten Bestandteilen der Zelle ein Atmungsmodell aufbauen,* welches die vitalen Oxydationen, wie mir es scheint, besser als das *Warburg*sche reproduziert.

Nach der von *A. Bach* (16) und später von *W. Palladin* (17) ausgearbeiteten Vorstellung vollzieht sich die aerobe Zellatmung nach

folgendem Schema: Der atmosphärische Sauerstoff oxydiert unter Mitwirkung der Oxydasen die „Atmungschromogene", Substanzen vom Typus der mehrwertigen Phenole. Dabei entstehen chinonartige Verbindungen, die sogenannten „Atmungspigmente". Letztere besitzen die Fähigkeit, bei gekoppelten, auf Kosten des Wassermoleküls verlaufenden Oxydoreduktionen den Wasserstoff zu binden, wodurch sie wieder zu den Chromogenen reduziert werden, während durch das Hydroxyl des Wassers verschiedene organische Substanzen (Kohlehydrate, Aminosäuren usw.) oxydiert werden. Die Reduktion der Pigmente zu Chromogenen (und folglich auch die damit verkoppelte Oxydation der organischen Substanzen) geht nur bei Vorhandensein reduzierender Fermente (Oxydoredukasen) mit hinreichender Geschwindigkeit vonstatten. An den vitalen Oxydationsprozessen beteiligen sich also ein Atmungschromogen, eine Oxydase, welche das Chromogen durch die Vermittlung des Luftsauerstoffs zum Pigment oxydiert, und eine Oxydoredukase, die die Reduktion des letzteren zum ursprünglichen Chromogen unter gleichzeitiger Oxydation der Substrate auf Kosten des Wassermoleküls bewirkt.

In vorliegender Arbeit wird über Oxydationsversuche mit den genannten Agenzien berichtet.

II. Oxydation von Glykokoll durch molekularen Sauerstoff in Gegenwart von Chlorogensäure.

Bereits im Jahre 1921 ist von mir (18) bewiesen worden, daß eine im Pflanzenreich weit verbreitete Verbindung, das Didepsid der Kaffeesäure und der Chinasäure, oder die sogenannte *Chlorogensäure*, ein typisches Atmungschromogen vorstellt. Diese Säure kann verhältnismäßig leicht in chemisch reinem, kristallisiertem Zustande aus einer Reihe von Objekten pflanzlicher Herkunft gewonnen werden.

In der soeben zitierten Arbeit stellte ich fest, daß die Chlorogensäure in alkalischer Lösung Sauerstoff absorbiert. Fügt man der Lösung Aminosäuren hinzu, so werden sie abgebaut, was an dem Verschwinden des Aminostickstoffs und dem Auftreten von freiem Ammoniak erkenntlich ist. Um der Kenntnis des hier in Betracht kommenden Prozesses näherzutreten, führte ich folgende Versuche aus.

In einer geräumigen Flasche wurden 10 ccm Chlorogensäurelösung (0,1 g in 50 ccm Wasser), 5 ccm Glykokoll (0,5 g in 25 ccm) und 6,5 ccm Phosphatlösung (5,0 g K_3PO_4 in 100 ccm H_2O) vermischt. Die H-Ionenkonzentration der Lösung, mittels der Gaskette bestimmt, betrug $p_H = 9,45$. In einer Reihe von Versuchen wurde Toluol als Antisepticum hinzugefügt. Es zeigte sich aber, daß schon die starke Alkaleszenz der Lösung genügt, um das Wachstum von Mikroorganismen in der Flüssigkeit zu verhindern. Die Flasche wurde mechanisch an der Luft geschüttelt. Die Temperatur betrug 18° C. Nach Verlauf von 24 Stunden wurde das entstandene Ammo-

niak bestimmt. Bemerkenswert ist, daß das Ammoniak sich nicht direkt aus der alkalischen Flüssigkeit abdestillieren ließ. Es ist offensichtlich nicht in freiem Zustande in der Lösung, sondern in der Form irgend einer Amidverbindung zugegen gewesen. (Es liegen Gründe vor, zu vermuten, daß es als Carbaminsäure gebunden war.) Deswegen wurde die Versuchsflüssigkeit erst mit Salzsäure angesäuert (0,5 ccm konzentrierter Säure) und 15 Minuten lang im siedenden Wasserbad erhitzt. Sodann wurde die Lösung neutralisiert, Magnesiumoxyd zugesetzt und das Ammoniak im Vakuum in titrierte Schwefelsäure überdestilliert. Der Säureverbrauch zur Neutralisierung des Ammoniaks betrug 2,6 ccm n/10 Schwefelsäure, entsprechend 3,6 mg Ammoniakstickstoff.

Der Destillationsrückstand wurde angesäuert und in einen 20-ccm-Meßkolben übergeführt. Hiervon wurden 5 ccm zur Aminostickstoffbestimmung nach *van Slyke* entnommen. 5 ccm lieferten 7,2 ccm Gas, entsprechend 4,05 mg Aminostickstoff oder, auf das Totalvolumen umgerechnet, 16,20 mg Amino-N. Die Kontrollbestimmung in der Versuchsflüssigkeit vor der Oxydation ergab 19,81 mg.

Es wurden daher unter obigen Bedingungen in 24 Stunden 3,64 mg Ammoniakstickstoff gebildet und ebensoviel (3,61 mg) Aminostickstoff war verschwunden.

Wurde die Lösung ohne Chlorogensäure hergestellt, so fand fast gar keine Abspaltung von Ammoniak auf Kosten des Aminostickstoffs statt.

Außer diesen Bestimmungen wurden auch Bestimmungen der bei der Oxydation gebildeten Kohlensäure ausgeführt. Es wurden gleichzeitig zwei Flaschen, die eine mit der oben beschriebenen Lösung, die andere zur Kontrolle mit Wasser statt Chlorogensäurelösung mit Luft geschüttelt. Nach 24 Stunden wurden aus den Flaschen je 15 ccm entnommen und der Kohlensäuregehalt nach der Methode von *Kniep* (19) bestimmt.

Versuchsflasche	—	17,95 mg CO_2
Kontrollflasche	—	9,80 mg CO_2
		8,15 mg CO_2 in 15 ccm Lösung,

oder, auf das Totalvolumen (21,5 ccm) bezogen, 11,68 mg CO_2. Sollte bei der Reaktion für jedes Molekül Ammoniak ein Molekül Kohlensäure ausgeschieden werden, so hätten sich theoretisch für 3,64 mg Ammoniakstickstoff 11,44 mg CO_2 bilden müssen.

In einer dritten Versuchsreihe wurde schließlich die Ameisensäure bestimmt. Die Versuchsflüssigkeit wurde nach 24stündiger Oxydation mit Wasserdampf destilliert und im Destillat die Ameisensäure nach dem Verfahren von *A. Lieben* (20) bestimmt. Es wurden 30,4 mg ameisensaures Barium erhalten. Theoretisch hätten sich für 3,64 mg Stickstoff 29,6 mg $Ba(HCOO)_2$ bilden müssen. Das erhaltene Bariumsalz gab alle Reaktionen der Ameisensäure. Außerdem wurde in einem Parallelversuch der Bariumgehalt des Salzes durch Überführung in Bariumsulfat ermittelt.

Berechnet 60,39 Proz. Ba; gefunden 60,29 Proz. Ba.

Im Gegensatz zu *Wieland* (21), der die Oxydation von Aminosäuren mittels des Kohlemodells ausführte, fand ich bei meinen Versuchen keinen Formaldehyd, sondern nur Ameisensäure. Wahrscheinlich entsteht auch hier zunächst Formaldehyd, der weiter zu Ameisensäure oxydiert wird.

Auf Grund der Resultate obiger Bestimmungen läßt sich die Reaktion durch folgende Bruttogleichung ausdrücken:

$$CH_2NH_2 . COOH + O_2 = HCOOH + NH_3 + CO_2.$$

Es mußte folglich zur Oxydation eines jeden Moleküls Glykokoll ein Molekül Sauerstoff verbraucht werden. Um nun festzustellen, wieviel Sauerstoff unter unseren Versuchsbedingungen tatsächlich absorbiert wurde, stellten wir folgende Versuche an.

Das Gemisch von Chlorogensäure- und Glykokollösungen wurde in einen geräumigen Erlenmeyerkolben gegeben und die erforderliche Phosphatlösung in einem kleinen Becher ebenfalls in den Kolben hineingestellt. Der Kolben wurde mittels eines mit Ableitungsröhre versehenen Gummipfropfens verschlossen. Das Ende der zweifach gebogenen Ableitungsröhre wurde in eine Schale mit Quecksilber eingetaucht. Das Aufsteigen des Quecksilbers in der Ableitungsröhre ermöglichte die Messung der Druckänderung im Innern des Kolbens. Da das im Kolben enthaltene Gasvolumen bekannt war, konnte danach die absorbierte Sauerstoffmenge mit großer Genauigkeit ermittelt werden. Der auf obige Weise beschickte Kolben wurde eine halbe Stunde zur Ausgleichung der Temperatur stehengelassen. Alsdann wurde der Stand des Quecksilbers in der Ableitungsröhre genau abgelesen, der Becher mit der Phosphatlösung durch einen scharfen Stoß umgestürzt und die Lösungen im Innern des Kolbens vermischt. Dann wurde der Kolben wieder eine halbe Stunde stehengelassen, damit sich die Temperatur im Innern von neuem mit der Außentemperatur ausglich. Nach Ablauf dieser Zeit wurde die erste Ablesung der absorbierten Gasmenge vorgenommen. Die Beobachtung wurde 2 Tage lang fortgesetzt. Die Mengen des verbrauchten Sauerstoffs in Kubikzentimetern auf 0° und 760 mm umgerechnet sind aus folgender Tabelle ersichtlich:

Zeit in Stdn.:	1/2	1	2	3	4	9	22	24	26	29	32	35	46	48	49
Verbrauchter O_2 in ccm	0,2	0,3	0,5	0,7	0,9	1,9	4,5	4,8	5,2	5,4	6,1	6,6	8,4	8,5	8,6

Gleichzeitig wurden in einem zweiten ebensolchen Kolben das entstandene Ammoniak und die Abnahme der Aminosäuremenge bestimmt. Unter diesen Bedingungen betrug die Menge abgespaltenen Aminostickstoffs in 24 Stunden nur 3,05 mg, in 48 Stunden 5,19 mg. Wie zu erwarten ist, verläuft die Oxydation im ruhig stehenden Kolben etwas langsamer als in der geschüttelten Flasche.

Vergleicht man die absorbierte Sauerstoffmenge mit der Menge des zur gleichen Zeit gespaltenen Glykokolls, so ergibt sich, daß auf ein Molekül Glykokoll tatsächlich ein Molekül Sauerstoff entfällt. Es wird daher sämtlicher von der Lösung absorbierte Sauerstoff zur

Oxydation des Glykokolls verbraucht. Die leicht oxydierbare Chlorogensäure scheint sich hier mit dem Sauerstoff nicht zu verbinden. Dies ist aber nur dann möglich, wenn die oxydierte Chlorogensäure fortwährend wieder zum Ausgangsstoff reduziert wird. Die Konzentration der Chlorogensäure während der ganzen Dauer des Versuchs muß also konstant bleiben. Die Sauerstoffkonzentration in der Flüssigkeit bei den Schüttelversuchen ist ebenfalls konstant. Nur der Gehalt an Glykokoll nimmt ab. Folglich muß der Reaktionsverlauf bei gleichbleibender Temperatur einer Gleichung erster Ordnung entsprechen.

Auf den ersten Blick bestätigt der eben beschriebene Versuch mit in Kolben gegossenen Lösungen diese Annahme nicht. Die Reaktionsgeschwindigkeit nimmt hier rascher ab als die Gleichung es fordert. Es ist aber nicht zu vergessen, daß im Laufe der Reaktion Ameisensäure gebildet wird, die trotz der Anwesenheit von Puffern (Glykokoll und Phosphat), das p_H der Lösung beträchtlich erniedrigt.

Diese Veränderung der Wasserstoffionenkonzentration kann beseitigt werden, indem in bestimmten regelmäßigen Intervallen soviel Phosphat oder titrierte Lauge zugesetzt wird, als nötig ist, um den ursprünglichen p_H-Wert aufrecht zu erhalten (selbstverständlich muß dabei das p_H der Lösung fortwährend mittels der Gaskette geprüft werden). Bei dieser Versuchsanordnung wurden folgende Resultate erhalten.

Temperatur 18° C. Anfängliche Stickstoffmenge 19,6 mg.
Abgespaltener Aminostickstoff in Milligrammen.

Zeit in Tagen	$p_H = 9{,}51$		$p_H = 9{,}42$	
	gefunden	berechnet	gefunden	berechnet
1	3,85	3,85	3,47	3,47
2	7,02	6,94	6,32	6,37
3	—	—	8,61	8,68
4	11,37	11,43	—	—
5	—	—	12,08	12,20
6	—	—	13,22	13,51
7	14,90	15,36	—	—
8	—	—	15,28	15,66
10	—	—	16,39	16,81
11	—	—	16,85	17,30
12	—	—	17,23	17,71

Aus den angeführten Resultaten ist ersichtlich, daß die Reaktion unter diesen Bedingungen genau der Gleichung für Reaktionen erster Ordnung folgt. Ohne Chlorogensäure erfolgt die Reaktion überhaupt nicht. Im Verlauf der Reaktion bleibt aber die Menge der Chlorogensäure unverändert. Folglich entspricht der Verlauf der Erscheinung dem oben dargelegten Schema.

Das Chromogen (die Chlorogensäure) wird durch den Sauerstoff der Luft oxydiert und in das Pigment übergeführt. Das Pigment wird auf Kosten des Wasserstoffs des Wassers wieder zum Chromogen reduziert, während das Glykokoll durch das Hydroxyl des Wassers oxydiert wird.

III. Die Oxydation der Chlorogensäure durch den molekularen Sauerstoff.

Es schien mir von Interesse, die Oxydation und die Reduktion der Chlorogensäure voneinander zu trennen und beide Vorgänge gesondert zu erforschen.

Zum Studium des Prozesses der Oxydation der Chlorogensäure durch Sauerstoff wurden folgende Versuche vorgenommen.

Eine Reihe der oben beschriebenen Erlenmeyerkolben wurde mit 10 ccm Chlorogensäurelösung (0,2 g Chlorogensäure in 50 ccm Wasser) beschickt. In jeden Kolben kamen 10 ccm der Lösung. Auf den Boden des Kolbens wurde ein Becher mit Phosphatlösung oder einem Gemisch von Phosphat und Ätzlauge gestellt. Die Menge des Phosphats und der Lauge wurde derart gewählt, daß das p_H der Flüssigkeit im Kolben nach der Vermischung der Chlorogensäurelösung mit dem Puffer einen bestimmten, im voraus festgestellten Wert erreichte. Außerdem wurde zur Chlorogensäurelösung so viel Wasser zugesetzt, daß das Gesamtvolumen der Flüssigkeit (Phosphat und Lauge mitgerechnet) in allen Kolben gleich blieb, und zwar 20 ccm betrug. Dann wurden die Kolben verschlossen und die Absorption des Sauerstoffs auf oben angegebene Weise bestimmt.

Die Ergebnisse der Bestimmungen sind in nachstehender Tabelle und dem Diagramm (Abb. 1) zusammengestellt.

Zeit in Stunden:	1/2	1	2	2 1/2	3	4 1/2	5 1/2	9	19 1/2	20 1/2	24	29	45	53
p_H = 12,9	1,3	—	2,9	3,2	3,4	—	—	4,3	4,9	—	5,1	—	—	5,2
p_H = 10,9	0,6	1,0	1,5	—	—	2,6	2,9	—	—	4,4	4,5	4,6	4,7	—
p_H = 9,6	0,2	—	0,6	—	0,8	—	1,2	1,6	2,8	—	3,1	—	—	3,3
p_H = 8,9	0,1	0,2	0,4	—	—	0,7	0,8	1,0	1,6	—	1,8	2,0	2,1	—
p_H = 7,8	0	0	—	—	—	—	0,1	0,2	0,5	—	0,6	—	1,2	1,5

Abb. 1.

Die angeführten Daten beweisen, daß bei erhöhter Alkaleszenz die Geschwindigkeit der Sauerstoffabsorption zunimmt.

Es war von Interesse, die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der OH-Ionenkonzentration zu ermitteln. Das Richtigste wäre selbstver-

ständlich, die Geschwindigkeitskonstante der Reaktion bei verschiedenen p_H-Werten zu bestimmen. Diese Bestimmung gelingt aber nicht. Die Oxydation der Chlorogensäure ist eine Summarreaktion. Wird die Lösung nicht mit Phosphat, sondern mit Ammoniak alkalisch gemacht, so läßt der Farbenumschlag der Lösung den Übergang von der einen Reaktion zur anderen erkennen. Die anfänglich gelbe-alkalische Chlorogensäurelösung wird bei der Oxydation zuerst intensiv grün, dann geht die Färbung in olivgrün über, um schließlich dunkelbraun zu werden. Es wäre also erforderlich, für jede der Reaktionen im einzelnen die Geschwindigkeitskonstante zu ermitteln. Über die dazu erforderlichen Anhaltspunkte verfüge ich aber vorerst noch nicht. Deswegen war ich genötigt, mich auf die Feststellung dei Abhängigkeit für die Summarreaktion als Ganzes zu beschränken.

Es ist leicht, aus unseren Versuchsergebnissen zu berechnen, wieviel Stunden zur Absorption eines Grammoleküls Sauerstoff durch ein Grammolekül Chlorogensäure erforderlich sind. Je höher der p_H-Wert, um so kürzer ist diese Zeit.

Betrachten wir die so erhaltenen Zahlen als Nenner eines Bruches, dessen Zähler gleich 100 ist, so erhalten wir eine Reihe von Zahlen, die eine gewisse Vorstellung von der Abhängigkeit zwischen der Hydroxylionenkonzentration und der Reaktionsgeschwindigkeit der Oxydation der Chlorogensäure durch molekularen Sauerstoff gibt.

p_H der Lösung:	7,8	8,9	9,6	10,9	12,4
Die Reaktionsgeschwindigkeit kennzeichnende Zahl a	46,0	13,0	5,8	1.5	0,47
$100/a$	2,17	7,61	17,1	66,6	212,7
$\log 100/a$	0,34	0,88	1,23	1,82	2,33

Wird diese Zahlenreihe logarithmiert und in ein Diagramm eingezeichnet, wo die Abszissenachse den p_H-Werten entspricht, so ergibt sich eine geradlinige Kurve. Nur die letzten zwei Zahlen sind etwas unterhalb dieser Geraden gelegen.

Der Grund liegt darin, daß die Oxydation bei hoher Alkaleszenz so rasch verläuft, daß die Diffusion des Sauerstoffs in das Innere der Flüssigkeit nicht mit genügender Geschwindigkeit erfolgen kann, um die Sauerstoffkonzentrationen der Lösung konstant zu erhalten.

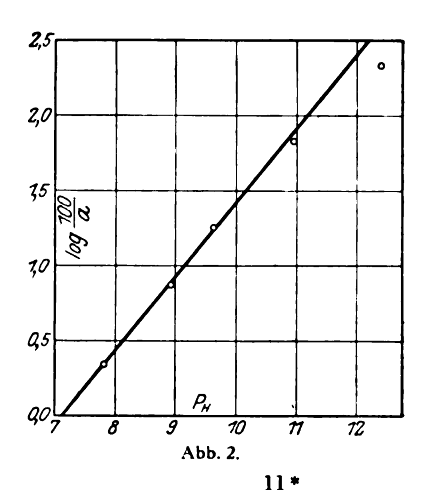


Abb. 2.

Zwischen der Hydroxylionenkonzentration und der Geschwindigkeit der Oxydation der Chlorogensäure durch molekularen Sauerstoff besteht also eine sehr einfache Abhängigkeit. Im Verlauf der Oxydation der Chlorogensäure bleibt die OH-Ionenkonzentration unverändert. Dies kann durch nachträgliche Messung des p_H der Lösung ohne Mühe bewiesen werden. Wird die Aufnahme von Kohlensäure aus der Luft durch besondere Maßnahmen verhindert, so bleibt das p_H der Flüssigkeit konstant. Das Hydroxylion spielt folglich in diesem Prozeß die Rolle eines Katalysators.

IV. Die Reduktion des bei der Oxydation der Chlorogensäure entstehenden Pigments.

Von der Konzentration der Hydroxylionen hängt nicht nur die Geschwindigkeit der Oxydation der Chlorogensäure durch den Luftsauerstoff ab, sondern auch die Geschwindigkeit der Reduktion des dabei entstehenden Pigments. Qualitativ läßt sich diese Abhängigkeit leicht wahrnehmen, wenn man ein Gemisch von Glykokollösung und in Gegenwart von Ammoniak oxydierter Chlorogensäure in evakuierten Ampullen zuschmilzt. Die anfangs intensiv grüne Lösung schlägt allmählich ins Gelbe um. Die Änderung der Farbe geht um so schneller vor sich, je höher die Hydroxylionenkonzentration der eingeschmolzenen Flüssigkeit war. Es ist kaum wahrscheinlich, daß die OH-Ionenkonzentration auf den Vorgang der Reduktion der Chlorogensäure eine direkte Wirkung ausübt. Am ehesten beschleunigt die Erhöhung der Alkaleszenz den Prozeß der Glykokolloxydation durch das Hydroxyl des Wassers. Dieser Prozeß geht aber nur dann mit nennenswerter Geschwindigkeit vor sich, wenn der gleichzeitig ununterbrochen freiwerdende Wasserstoff des Wassers durch einen geeigneten Akzeptor beseitigt wird, in unserem Falle durch die oxydierte Chlorogensäure. Je rascher der Prozeß der Glykokolloxydation verläuft, desto rascher spielt sich auch der damit verkoppelte Vorgang der Reduktion des Pigments zum Chromogen ab.

Zum quantitativen Studium dieses Prozesses wurde folgendes Verfahren angewendet. 25 ccm Chlorogensäurelösung (0,2 g in 50 ccm) wurden mit 5 ccm Phosphatlösung und 20 ccm Wasser vermischt. $p_H = 9,6$. Die Lösung wurde in Erlenmeyerkolben gebracht und 16 Stunden stehengelassen. Während dieser Zeit wurden 6,2 ccm Sauerstoff absorbiert, was 8,82 mg O_2 entspricht. Von der oxydierten Chromogenlösung wurden 40 ccm mit 20 ccm Glykokollösung (0,5 g in 25 ccm) und 20 ccm Phosphat-Laugegemisch versetzt, so daß p_H der Lösung gleich 9,6 blieb. Dann wurde das Gemisch in eine sorgfältig evakuierte Ampulle eingeschmolzen. Nach 35 Stunden wurde die Ampulle geöffnet und in der Lösung quantitativ das gebildete Ammoniak und die Abnahme des Aminostickstoffs bestimmt. Die Menge des abgespaltenen Aminostickstoffs betrug 3,04 mg. Wäre die ganze Menge des von den 40 ccm Chlorogensäurelösung absorbierten

Sauerstoffs, also 7,05 mg, zur Oxydation des Glykokolls nach der oben angegebenen Gleichung verbraucht worden, so hätten 3,08 mg Ammoniakstickstoff entstehen müssen. Diese Zahl gibt also die maximale Menge des unter solchen Bedingungen abspaltbaren Stickstoffs an. Auf die beschriebene Weise wurde eine ganze Reihe Ampullen beschickt. Dabei wurde in den einzelnen Ampullen mittels Phosphat und Lauge p_H auf verschiedene Werte eingestellt. Zur Analyse des Inhalts wurden Ampullen 1,5 und 10 Stunden nach Beginn des Versuchs geöffnet.

Die Resultate der Analysen in Milligrammen Stickstoff sind in folgender Tabelle enthalten.

p_H der Lösung:	7,5	8,0	9,0	9,6	10,5	12,0
1 Stunde nach dem Zuschmelzen	—	—	—	0,32	0,48	0,99
5 Stunden nach dem Zuschmelzen	—	0,49	0,86	1,23	—	—
10 „ nach dem Zuschmelzen	0,77	0,89	1,54	—	—	—

Bei dieser Versuchsanordnung schwankte die Hydroxylionenkonzentration und die Glykokollkonzentration im Laufe des Versuchs unbedeutend. Wesentlich änderte sich nur die Konzentration der oxydierten Chlorogensäure. Deswegen mußte der Reaktionsverlauf der Gleichung erster Ordnung entsprechen.

Aus den oben angegebenen Resultaten läßt sich berechnen, wie sich die Konstante der Reaktionsgeschwindigkeit mit dem p_H-Wert ändert.

p_H der Lösung:	7,5	8,0	9,0	9,6	10,5	12,0
Konstante K .	0,012	0,015	0,029	0,045	0,074	0,167
log (K . 100) .	0,092	0,18	0,47	0,65	0,87	1,22

Trägt man die Logarithmen von K als Ordinaten und die p_H-Werte als Abszissen auf, so erhält man eine gerade Linie.

Folglich haben wir es auch hier, wie bei der Oxydation der Chlorogensäure, mit einer einfachen Abhängigkeit zwischen Reaktionsgeschwindigkeit und Hydroxylionenkonzentration zu tun.

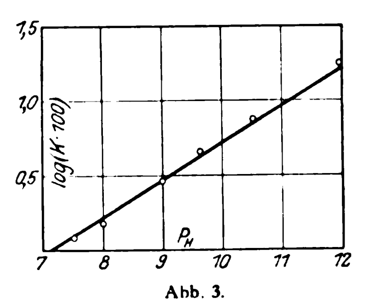


Abb. 3.

Die geraden Linien, die unsere Versuchsergebnisse graphisch darstellen, können nicht ohne weiteres aufeinandergelegt werden, da sie unter verschiedenen Versuchsbedingungen erhalten und die Resultate in verschiedenen Einheiten ausgedrückt wurden. Das eingehende Studium unserer Daten zeigt aber, daß bei Erhöhung der p_H die Geschwindigkeit des Reduktionsprozesses viel langsamer als die des Oxydationsprozesses wächst.

Wenn die Reaktion des Milieus sich der neutralen nähert, kommt die Oxydation der Chlorogensäure durch den Luftsauerstoff fast gänzlich zum Stillstand, während die Reduktion noch mit merklicher Geschwindigkeit stattfindet. Umgekehrt bei höheren p_H-Werten, die Oxydation geht schneller als die Reduktion.

In dem von mir beschriebenen Gemisch von Chlorogensäure-, Glykokoll- und Phosphatlösungen gehen also gleichzeitig zwei Reaktionen vor sich: Die Oxydation der Chlorogensäure durch molekularen Sauerstoff und die Reduktion des dabei entstehenden Pigments durch den Wasserstoff des Wassers. Letztere Reduktion ist mit der Oxydation des Glykokolls verkoppelt. Die Geschwindigkeit der einen wie der anderen Reaktion ist um so größer, je höher die Hydroxylionenkonzentration ist. Bei $p_H < 9,5$ ist aber die Reaktionsgeschwindigkeit der Pigmentreduktion größer als die Reaktionsgeschwindigkeit der Oxydation der Chlorogensäure durch den freien Sauerstoff. Unter diesen Bedingungen muß alles sich bildende Pigment sofort zur Oxydation des Glykokolls verbraucht werden. Umgekehrt findet bei $p_H < 9,5$ die Oxydation der Chlorogensäure rascher statt als die Pigmentreduktion. Folglich muß sich bei genügend hoher Alkaleszenz Pigment in der Lösung anhäufen.

V. Die Geschwindigkeit der Summarreaktion der Oxydation von Glykokoll durch freien Sauerstoff in Gegenwart von Chlorogensäure bei verschiedenen p_H-Werten.

Es wurden Versuche über die Oxydation von Glykokoll durch freien Sauerstoff in Gegenwart von Chlorogensäure bei verschiedenen p_H-Werten von mir ausgeführt. Chlorogensäure- und Glykokollösungen wurden in dem anfangs angegebenen Verhältnis vermischt. Durch Zusatz der geeigneten Phosphat- und Laugelösungen wurde das Gemisch auf bestimmte Hydroxylionenkonzentrationen eingestellt. Die Lösungen wurden in Flaschen geschüttelt und nach 24 Stunden wurden Bestimmungen des Ammoniaks und des Aminostickstoffs (nach *van Slyke*) ausgeführt. Die Ergebnisse der Bestimmungen, in Milligrammen Stickstoff ausgedrückt, sind in nachstehender Tabelle angegeben.

p_H der Lösung:	8,1	8,8	9,1	9,5	10,1	11,4	12,1
Gebildeter Ammoniakstickstoff in mg, A	0,28	0,76	1,35	3,6	5,7	6,3	3,3
log A	$\bar{1}$,45	$\bar{1}$,88	0,13	0,56	0,76	0,80	0,52

Aus nachstehendem Diagramm ist ersichtlich, daß die Kurve in ihrem Anfangsteil als logarithmische Kurve verläuft, dann aber bedeutend von ihrer ursprünglichen Richtung abweicht und schließlich

bei sehr hohen p_H-Werten einen absteigenden Verlauf annimmt. $p_H = 9,5$ scheint die ganze Kurve in zwei Hälften zu teilen. Links ist die Abhängigkeit zwischen OH-Ionenkonzentration und Reaktionsgeschwindigkeit verhältnismäßig einfach, rechts ist diese Abhängigkeit erheblich komplizierterer Art.

Betrachten wir zunächst den linken Teil des Diagramms. Bei niedriger OH-Ionenkonzentration verläuft die Oxydation der Chlorogensäure durch den Sauerstoff langsamer als ihre Reduktion durch das Glykokoll; die Geschwindigkeit des ganzen Prozesses wird folglich durch die Geschwindigkeit der Sauerstoffabsorption durch die Lösung bestimmt. Wie oben erwähnt, besteht zwischen der in einer Zeiteinheit absorbierten Sauerstoffmenge und der OH-Ionenkonzentration eine einfache Abhängigkeit, die durch eine geradlinige Kurve ausgedrückt werden kann. Es ist daher begreiflich, daß auch hier dieselbe Abhängigkeit zutage kommt.

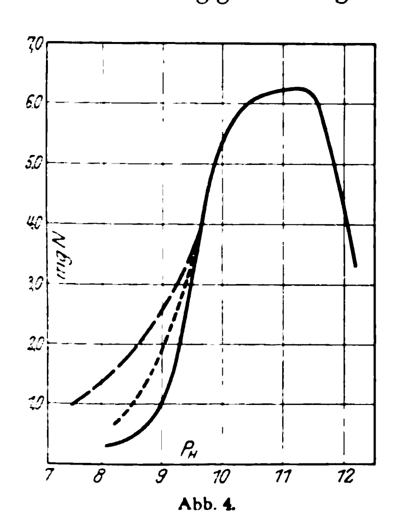


Abb. 4.

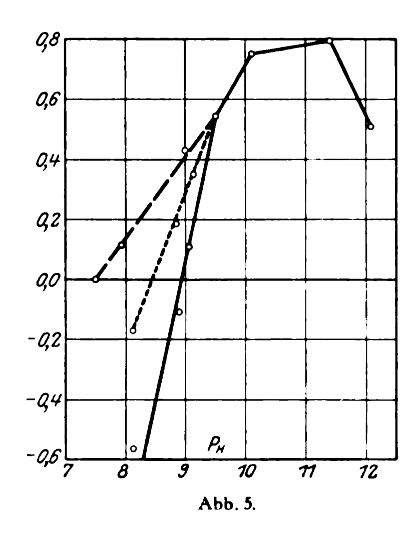


Abb. 5.

Jede Beschleunigung der Sauerstoffabsorption durch die Lösung muß bei den betreffenden p_H-Werten die Geschwindigkeit des Gesamtprozesses erhöhen. Dies trifft in der Tat zu.

Chlorogensäurelösung wurde zuerst durch molekularen Sauerstoff 24 Stunden lang bei $p_H = 9,6$ oxydiert; sodann wurde der Lösung so viel Glykokoll und Phosphat zugesetzt, daß die Konzentration von Chlorogensäure und Glykokoll die gleiche war wie in den vorangehenden Versuchen, und $p_H = 9,1$.

Nach Ablauf weiterer 24 Stunden enthielt die Lösung 2,24 mg Ammoniakstickstoff, anstatt der üblichen 1,35 mg. Desgleichen erhöht sich die ursprüngliche Geschwindigkeit des Gesamtprozesses bis zu gewissen Grenzen auch bei der Anwendung erhöhter Chlorogensäurekonzentrationen. Zu

diesem Zwecke wurden Versuchslösungen verwendet, die statt der üblichen 20 mg Chlorogensäure 40, 80 und 160 mg enthielten. Die Abhängigkeit zwischen der Menge von Chlorogensäure in der Versuchsflüssigkeit und der abgespaltenen Ammoniakstickstoffmenge ist aus folgender Tabelle ersichtlich.

p_H in allen Proben gleich 9,0.

Chlorogensäuregehalt in mg:	2	10	20	40	80	160
Ammoniakstickstoff in mg	0,11	0,59	1,19	1,60	2,10	2,40

Um den Prozeß der Oxydation der Chlorogensäure wesentlich zu beschleunigen, verfuhr ich auf folgende Weise.

Das Gemisch von Chlorogensäure-, Glykokoll- und Phosphatlösung wurde statt der gewöhnlichen Flasche in eine Saugflasche gebracht. Der Hals der Saugflasche wurde durch einen Gummistopfen verschlossen, durch dessen Bohrung das untere Ende einer Bürette in die Flasche hineinragte. Die Saugflasche wurde sorgfältig evakuiert und aus der Bürette sehr langsam (1 ccm in 6 Stunden) 1proz. H_2O_2-Lösung hinzufließen gelassen. Da das Wasserstoffsuperoxyd an und für sich bei niedrigen p_H-Werten die Chlorogensäure sehr schwach oxydiert, wurde dem Gemisch in der Saugflasche von vornherein Peroxydase aus Meerrettich zugesetzt. In Gegenwart von Peroxydase wird die Chlorogensäure durch Wasserstoffsuperoxyd mit großer Geschwindigkeit oxydiert[1]).

Bei dieser Versuchsanordnung wurde folglich in der Lösung fortwährend eine hohe Pigmentkonzentration aufrecht erhalten. Die Bestimmung des in 24 Stunden bei verschiedenen p_H-Werten in der Lösung freigewordenen Ammoniakstickstoffs ergab folgende Zahlenreihe[2]).

p_H der Lösung:	7,5	7,9	9,0	9,5
Abgespaltener Ammoniakstickstoff in mg, B	1,0	1,3	2,6	3,6
log B	0,0	0,11	0,42	0,56

In Abwesenheit von Chlorogensäure bleibt die Oxydation des Glykokolls durch H_2O_2 bei niedrigen p_H-Werten fast gänzlich aus[3]).

p_H der Lösung:	7,5	7,9	9,0
Abgespaltener Ammoniakstickstoff in mg . .	0,0	Spuren	0,2

In den voranstehenden Diagrammen ist diese Reihe durch eine durchbrochene Linie wiedergegeben. Wie leicht zu ersehen ist, entspricht

[1]) Qualitativ leicht am Auftreten der Grünfärbung bei Oxydation in ammoniakalischer Lösung zu erkennen.

[2]) Die Gesamtmenge des hinzugefügten Wasserstoffsuperoxyds war überall die gleiche und betrug je 4 ccm 1proz. H_2O_2.

[3]) Vgl. *E. Negelein*, diese Zeitschr. **142**, 493, 1923.

ihr Verlauf dem einer logarithmischen Kurve. Unter den beschriebenen Bedingungen ist das Pigment fortwährend im Überschuß zugegen; deswegen wird die Geschwindigkeit des Gesamtprozesses durch die Geschwindigkeit der Reduktion der Chlorogensäure bestimmt; letztere ist aber um so höher, je höher die Hydroxylionenkonzentration ist.

VI. Die Rolle des Eisens bei der Oxydation von Glykokoll durch molekularen Sauerstoff.

Nach *Warburgs*[1]) Ansicht kann die Oxydation organischer Substanzen durch molekularen Sauerstoff nur unter Vermittlung von Eisen erfolgen. Es war deswegen von Interesse, festzustellen, ob in dem von mir beschriebenen Falle Eisen an der Oxydation des Glykokolls teilnimmt. Zur Klärung dieser Frage stellte ich eine Reihe von Versuchen mit allem Anschein nach völlig eisenfreien Lösungen an. Zur Herstellung dieser Lösungen wurde vielfach umkristallisierte Chlorogensäure angewendet. Weder unmittelbar in der Lösung der Säure, noch nach deren Veraschung konnten die geringsten Spuren Eisen nachgewiesen werden. Das Glykokoll war ebenfalls eisenfrei. In dem von mir angewendeten Phosphat war gleichfalls kein Eisen nachweisbar; trotzdem ersetzte ich es in einigen Versuchen durch Natronlauge, die ich unter peinlichsten Kautelen aus metallischem Natrium herstellte. Zur Herstellung der Lösungen gebrauchte ich doppelt aus Jenaer Glasretorten destilliertes und auf Abwesenheit von Eisen und anderen Metallen geprüftes Wasser. Die eigentliche Reaktion wurde ebenfalls in Gefäßen aus Jenaer Glas ausgeführt. Trotzalledem blieb die Geschwindigkeit der Glykokolloxydation dieselbe wie in den früheren Versuchen. Durch Zusatz von KCN in verschiedenen Konzentrationen zu der Lösung wurde der Oxydationsprozeß nicht merklich beeinflußt. Bei niedrigen Konzentrationen wurde dieselbe Ammoniakmenge wie im Kontrollversuch abgespalten, bei höheren Konzentrationen konnte sogar eine gewisse Erhöhung der Ammoniakmenge beobachtet werden.

Die Oxydation des Glykokolls durch molekularen Sauerstoff fand also hier auch in *Abwesenheit von Eisen* mit merklicher Geschwindigkeit statt. Zusatz von Eisen in Ferri- oder Ferroform zur Chlorogensäurelösung hatte *keine Beschleunigung* der Oxydation des Chromogens durch freien Sauerstoff zur Folge. Dennoch wurde der Verlauf der Glykokolloxydation in Gegenwart von Chlorogensäure durch Zusatz von Ferrosalzen in auffallender Weise beeinflußt. Nachstehende Tabelle enthält die Resultate der Oxydation von Glykokoll durch Sauerstoff in Gegen-

[1]) Außer den oben zitierten Arbeiten s. *O. Warburg* und *S. Sakuma*, Arch. f. d. ges. Physiol. **200**, 203, 1923; *S. Sakuma*, diese Zeitschr. **142**, 68, 1923.



wart von Chlorogensäure, die erhalten wurden, wenn zu dem üblichen Versuchsgemisch noch eine sehr kleine Menge (etwa 0,1 mg) Eisen als Ferrosalz zugesetzt wurde.

p_H der Lösung:	8,2	8,8	9,1	9,6
Abgespaltener Stickstoff in mg, C .	0,67	1,52	2,15	3,8
log C	$\bar{1}$,83	0,18	0,33	0,58

Die Zahlen sind in den Diagrammen Abb. 4 und 5 graphisch durch punktierte Kurven wiedergegeben. Es ist augenfällig, daß das Glykokoll bei $p_H < 9{,}6$ in Gegenwart von Eisen bedeutend rascher oxydiert wird als in eisenfreiem Milieu.

Die Erklärung dieser Erscheinung ergibt sich, wenn wir die Totalbilanz der Reaktion aufstellen. Wird die Oxydation des Glykokolls in Abwesenheit von Eisen bei $p_H = 9{,}0$ in Erlenmeyerkolben ausgeführt und dabei nicht nur der abgespaltene Ammoniakstickstoff, sondern auch die absorbierte Sauerstoffmenge bestimmt, so stellt sich heraus, daß mehr Sauerstoff verbraucht worden ist, als der Gleichung

$$CH_2NH_2COOH + O_2 = HCOOH + NH_3 + CO_2$$

entspricht.

Es wurden z. B. bei dieser Versuchsanordnung in 24 Stunden 2,7 ccm O_2 absorbiert, dagegen in dieser Zeit nur 1,12 mg Aminostickstoff abgespalten, was 1,8 ccm O_2 entspricht. Ganz ähnlich wurden in 48 Stunden 4,8 ccm O_2 verbraucht und 2,05 mg Ammoniakstickstoff gebildet, wozu theoretisch 3,3 ccm Sauerstoff erforderlich waren.

Es zeigt sich mit Bestimmtheit, daß bei $p_H = 9{,}0$ nicht die ganze Menge des absorbierten Sauerstoffs zur Oxydation des Glykokolls verbraucht wird. Ein Teil des Sauerstoffs bleibt in gebundener Form in der Lösung. Gemäß der Theorie von *A. Bach* (22) muß bei der Oxydation mehrwertiger Phenole durch gasförmigen Sauerstoff in wässerigem Milieu Wasserstoffsuperoxyd entstehen (23). Werden die beschriebenen Lösungen mit Äther extrahiert, so geht tatsächlich, wie es vor kurzem *Wieland* und *Fischer* (24) zeigten, H_2O_2 in den Äther über. Die H_2O_2-Menge kann leicht mit Hilfe von Titansäure quantitativ bestimmt werden.

In 24 Stunden bilden sich 2,7 mg H_2O_2, in 48 Stunden 5,2 mg H_2O_2. Dies stimmt gut mit dem Überschuß an absorbiertem Sauerstoff überein (theoretisch hätten 2,8 und 5,1 mg H_2O_2 entstehen müssen).

In Gegenwart von Ferrosalz wird das Wasserstoffsuperoxyd rasch zur Oxydation des Glykokolls verbraucht (25). Wahrscheinlich wird auch hier nicht das Glykokoll, sondern die Chlorogensäure primär oxydiert. In dieser additionellen Oxydation liegt die Erklärung der Erhöhung der ursprünglichen Reaktionsgeschwindigkeit bei Eisen-

zusatz. Aus den oben angeführten Zahlen ist ersichtlich, daß bei $p_H = 9,0$ ein Drittel der Gesamtmenge des absorbierten Sauerstoffs als H_2O_2 nicht ausgenützt bleibt Dementsprechend steigt bei Eisenzusatz die abgespaltene Stickstoffmenge um etwa 50 Proz. an.

Bei $p_H > 9,6$ wird sämtliches sich bildende Wasserstoffsuperoxyd im Laufe des Oxydationsprozesses aufgebraucht; deswegen beeinflußt die Zugabe von Eisensalzen bei dieser OH-Ionenkonzentration die Reaktionsgeschwindigkeit nicht mehr. Daraus ergibt sich, daß die Rolle des Eisens bei unseren Versuchsbedingungen sich auf die Erhöhung des Oxydationsvermögens des Wasserstoffsuperoxyds (Peroxydasefunktion) beschränkt.

VII. Die Bildung des braunen inaktiven Pigments.

In Lösungen mit p_H-Werten über 9,6 verläuft die Oxydation der Chlorogensäure rascher als ihre Reduktion. Man kann sich leicht überzeugen, daß der Verlauf der Kurve des Gesamtprozesses der Glykokolloxydation in diesem Teile des Diagramms starke Unregelmäßigkeiten aufweist. Dies gibt Veranlassung zu der Annahme, daß unter diesen Bedingungen möglicherweise noch ein dritter Prozeß sich zu den Vorgängen der Oxydation und Reduktion der Chlorogensäure hinzugesellt.

Stellen wir die Totalbilanz der Reaktion der Glykokolloxydation bei p_H-Werten $> 9,6$ auf, so ergibt sich, daß auch hier, wie bei $p_H = 9,0$, mehr Sauerstoff absorbiert wird, als der Gleichung entspricht So hat z B. bei $p_H = 10,0$ und bei $p_H = 12,1$ ein Gemisch von Glykokoll- und Chlorogensäurelösungen folgende Mengen Sauerstoffs (in Kubikzentimeter Gas, auf normale Temperatur und Druck umgerechnet) absorbiert:

Zeit in Stdn.:	1/2	1	2	3	4	9	20	22	24
$p_H = 10,0$	0,2	0,5	0,8	1,0	1,4	2,6	5,4	6,0	6,6
$p_H = 12,1$	0,6	1,0	1,6	2,0	2,6	3,8	5,5	5,7	5,9

In 24 Stunden wurden bei $p_H = 10,0$ 6,6 ccm O_2 absorbiert; zur gleichen Zeit wurden 3,90 mg Ammoniakstickstoff gebildet, entsprechend 6,3 ccm O_2. Bei $p_H = 12,1$ wurden 5,9 ccm O_2 absorbiert und 2,34 mg Ammoniakstickstoff gebildet, wozu bloß 4,0 ccm O_2 erforderlich sind. Bei den angegebenen Hydroxylionenkonzentrationen erfolgt keine nennenswerte Anhäufung von Wasserstoffsuperoxyd in der Lösung. Folglich wurde der ganze Überschuß an absorbiertem Sauerstoff an die Chlorogensäure gebunden und zur tieferen Oxydation des bereits entstandenen Pigments verbraucht.

Wie eingangs erwähnt, verläuft die Oxydation der Chlorogensäure in mehreren Stufen. Ein Grammolekül der Säure absorbiert in Lösung

bei genügend hoher OH-Ionenkonzentration nacheinander 4 g-Moleküle O_2 (s. Tabelle S. 162). Dabei verändert sich (in Gegenwart von Ammoniak) die Farbe der Lösung, indem sie aus dem Gelben ins Grüne, Olivengrüne und Dunkelbraune umschlägt. Nur das grüne und zum Teil das olivengrüne Pigment kann durch Glykokoll wieder zum Ausgangsstoff reduziert werden. Das braune Pigment wird nicht mehr reduziert, ebensowohl als das Glykokoll in Gegenwart dieses Pigments nicht oxydiert wird.

Auf den ersten Blick wäre man geneigt anzunehmen, daß bei der Entstehung des braunen Pigments die Hauptrolle der zerstörenden Wirkung des Alkalis zugehöre. Das trifft aber nicht zu. Eine alkalische Lösung von Chlorogensäure ($p_H = 11,0$) kann in evakuierten und zugeschmolzenen Ampullen mehrere Wochen aufbewahrt werden, ohne ihre ursprünglichen Eigenschaften einzubüßen, während sie an der Luft bereits nach 2 bis 3 Tagen tiefbraun wird und in beträchtlichem Maße die Fähigkeit verliert, Glykokoll zu oxydieren. Und umgekehrt kann man auch bei geringer Alkaleszenz die Bildung des braunen Pigments erzielen, wenn man die Lösung sehr lange mit Luft durchschüttelt oder die Oxydation der Lösung energisch mittels Wasserstoffsuperoxyd in Gegenwart von Peroxydase ausführt. Bei der Bildung des braunen Pigments spielen Oxydationsvorgänge die Hauptrolle.

Um von dem Einfluß der Bildung dieses Pigments auf den allgemeinen Verlauf der Glykokolloxydation eine Vorstellung zu geben, wurden Versuche mit vorangehender Oxydation der Chlorogensäure durch Sauerstoff bei $p_H > 9,6$ ausgeführt. Drei Flaschen wurden mit je 5 ccm Chlorogensäurelösung (0,2 g in 50 ccm) beschickt. Die Lösung wurde mit so viel Phosphatlaugegemisch und Wasser versetzt, daß das Gesamtvolumen in jeder Flasche 10 ccm und p_H in Nr. 1 9,6, in Nr. 2 10,9 und in Nr. 3 12,0 betrug. Die Lösungen wurden 2 Tage lang mit Luft geschüttelt. Alsdann wurden in jede Flasche 5 ccm Glykokollösung (0,5 g in 25 ccm) und Phosphatlösung gegeben. Gesamtvolumen der Flüssigkeit in jeder Probe 20 ccm bei $p_H = 9,6$. Dann wurde das Schütteln noch weitere 24 Stunden fortgesetzt und die Lösungen der Analyse unterworfen. Statt der gewöhnlich bei diesem p_H-Wert frei werdenden 4,2 mg Ammoniakstickstoff erhielt ich bei dieser Versuchsanordnung in Nr. 1 2,52 mg, in Nr. 2 1,21 mg und schließlich in Nr. 3 0,42 mg.

Bei $p_H > 9,6$ also setzt die vorangehende Oxydation der Chlorogensäure die Geschwindigkeit der Glykokolloxydation bedeutend herab. Bei $p_H < 9,6$ beschleunigt dieses Verfahren im Gegenteil, wie oben erwähnt, die Oxydation.

Das bei der Oxydation der Chlorogensäure durch den Sauerstoff der Luft entstehende Atmungspigment kann sich in zweierlei Richtungen weiter verändern. Entweder wird es wieder zu Chlorogensäure reduziert und kann dann von neuem am Oxydationsprozeß teilnehmen, oder es

wird weiter oxydiert und geht in das braune Pigment über. In letzterem Falle ist seine Rolle bei dem Oxydationsprozeß zu Ende.

Die Oxydation des Glykokolls durch molekularen Sauerstoff in Gegenwart von Chlorogensäure kann nur dann mit gleichmäßiger Geschwindigkeit erfolgen, wenn der Reduktionsprozeß vollkommen mit dem Oxydationsprozeß Schritt hält. Ist dies nicht der Fall, verläuft also die Oxydation der Chlorogensäure mit größerer Geschwindigkeit als ihre Reduktion, so geht stets ein Teil der Säure in das inaktive braune Pigment über und wird auf diese Weise dem Gesamtprozeß entzogen. Unter diesen Bedingungen muß die Oxydation des Glykokolls allmählich abnehmen, und zwar ist die Abnahme um so steiler, je stärker die Geschwindigkeit der Reduktion des Atmungspigments hinter der Geschwindigkeit der Oxydation des Chromogens zurückbleibt.

VIII. Die Oxydation des Glykokolls in Gegenwart von Chlorogensäure unter der Mitwirkung der Phenoloxydase und der Oxydoredukase.

In den bisher beschriebenen Versuchen wurde festgestellt, daß sowohl die Oxydation wie die Reduktion der Chlorogensäure durch Hydroxylionen beschleunigt wird. Deswegen erfolgte auch die Glykokolloxydation mit erheblicher Geschwindigkeit nur bei relativ hoher Alkaleszenz der Versuchslösung. In der lebenden Zelle kommt eine so hohe Alkaleszenz niemals vor. Hier treten aber an Stelle der OH-Ionen ebenso wirksame katalytische Agenzien auf, die Oxydase und die Oxydoredukase.

Bekanntlich lassen sich mehrwertige Phenole in Gegenwart von pflanzlicher Phenoloxydase durch den Luftsauerstoff leicht in neutralem und sogar schwachsaurem Milieu oxydieren. Auf ähnliche Weise wird die Reduktion einer Reihe von Substanzen (z. B. Methylenblau und andere) durch die Wirkung der Oxydoredukase in hohem Maße beschleunigt. Es schien möglich, auch in unserem Falle das Hydroxylion durch Lösungen der genannten Fermente zu ersetzen.

7 Tage alte Sonnenblumenkeimlinge wurden von den Hülsen befreit, bei 45° C getrocknet, mit Benzin entfettet und sorgfältig zerkleinert. 1 g des so erhaltenen Mehles wurde mit 20 ccm Wasser angerührt und 12 Stunden in der Kälte (bei 2° C) stehengelassen. Nach der Filtration erhielten wir einen vollständig klaren, braunen Extrakt, der an und für sich weder in saurem, noch in schwach alkalischem Milieu nennenswerte Mengen Sauerstoff absorbierte. Hingegen erhöhte er die Geschwindigkeit der Sauerstoffabsorption durch Chlorogensäurelösungen in sehr bedeutendem Maße. Wurden im Erlenmeyerkolben mit Ableitungsröhre 10 ccm Chlorogensäurelösung (0,2 g pro 20 ccm), 3 ccm Extrakt und 7 ccm Wasser vermischt, so konnte beobachtet werden, daß die Chlorogensäure unter diesen Bedingungen sogar bei niedrigen p_H-Werten energisch Sauerstoff absorbiert.

In folgender Tabelle sind die bei zwei Versuchen absorbierten Sauerstoffmengen in Kubikzentimetern (korrigiert) angegeben.



Zeit in Stunden:	1/2	1	1 1/2	2	2 1/2	4	7 1/2	9
Saure Lösung . . .	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,7	1,1	1,2
Schwach alkalische Lösung, $p_H = 7,6$	1,0	1,4	1,8	2,0	2,1	2,3	2,6	2,7

Aus diesen Zahlen geht hervor, daß die Chlorogensäure in Gegenwart des Extrakts sogar in saurem Milieu mit merklicher Geschwindigkeit Sauerstoff aus der Luft absorbiert. (Die Geschwindigkeit ist annähernd dieselbe, die bei Abwesenheit des Ferments bei $p_H = 9,0$ erreicht wird.) In schwach alkalischem Milieu verläuft der Prozeß mit derselben Geschwindigkeit, mit der er in fermentfreier Lösung bei $p_H = 11$ bis 12 vor sich geht. Diese Beschleunigung der Oxydation der Chlorogensäure wird zweifellos durch die Phenoloxydase bewirkt (26). Die Anwesenheit eines Reduktionsferments (Oxydoredukase) im Extrakt kann ebenfalls nachgewiesen werden[1]). Trotzdem wird Glykokoll durch den Extrakt nicht in nennenswertem Maße oxydiert. Dies hängt davon ab, daß der Extrakt keine Chlorogensäure enthält. Die ganze Chlorogensäure, die aus den lebenden Keimlingen leicht mit kochendem, 70proz. Alkohol extrahiert werden kann, wird bei der Extraktion mit Wasser und dem darauffolgenden Filtrieren durch den Sauerstoff der Luft oxydiert und in das stabile, braune Pigment verwandelt, das dem Extrakt seine charakteristische Färbung verleiht. Ein Versuch, aus diesem Extrakt Chlorogensäure zu isolieren, mißlang vollständig.

Wird jedoch der Extrakt mit Chlorogensäurelösung vermengt, so gewinnt das Gemisch die Fähigkeit, Glykokoll auf Kosten des atmosphärischen Sauerstoffs zu oxydieren. Die Versuche wurden unter folgenden Bedingungen ausgeführt.

Vermischt wurden 10 ccm Chlorogensäurelösung (0,1 g in 50 ccm), 5 ccm Glykokollösung (0,5 g in 25 ccm), 2 ccm Extrakt und 3 ccm Wasser[2]), das so viel Bicarbonat oder Phosphat enthielt, als nötig war, um dem ganzen Gemisch ein p_H von 7,6 bis 7,8 zu erteilen. Das Gemisch wurde in ein breites, dickwandiges Reagenzglas gegossen. Bereits nach 2 bis 3 Minuten nahm die Lösung die charakteristische grüne Farbe an. Dann wurde das Reagenzglas mittels eines Gummistopfens, in dessen Bohrung ein Glasrohr mit Hahn hineingefügt war, verschlossen. Die Luft wurde möglichst vollständig aus dem Reagenzglas ausgepumpt und die Lösung in einer Stickstoff- oder Wasserstoffatmosphäre stehengelassen. Bei dieser Versuchsanordnung erfolgte die Reduktion des Pigments zum ursprünglichen Chromogen. Die Geschwindigkeit des Prozesses war aber relativ gering. Erst nach 3 Stunden schlug die grüne Farbe der Lösung wieder ins Gelbe um. Alsdann wurde wieder Sauerstoff oder Luft in das Reagenz-

---

[1]) Methoden zur quantitativen Bestimmung dieses Ferments in Extrakten aus gekeimten Samen werden gegenwärtig von mir ausgearbeitet.

[2]) Zur Herstellung der Lösungen wurde stets frisch gekochtes Wasser verwendet.

glas eingelassen. Die Lösung färbte sich wiederum grün. Sie wurde 1 Minute an der Luft stehengelassen und dann wieder im sauerstofffreien Raume abgeschlossen. Dabei beginnt wieder die Reduktion des Pigments, die ebenso wie das erste Mal erst nach 3 Stunden vollständig ist.

Obwohl die Reduktion des Pigments in Gegenwart von Extrakt bedeutend rascher erfolgt als ohne denselben, ist jedoch die Geschwindigkeit der Oxydation der Chlorogensäure um ein Vielfaches (100- bis 200fach) größer als die Geschwindigkeit des Reduktionsprozesses. Die Gegenwart des Extrakts schafft also ähnliche Bedingungen wie die starke Alkaleszenz.

Obiges Verhältnis zwischen dem Oxydations- und dem Reduktionsprozeß konnte ich etwas abändern, indem ich dem Gemisch aus Milch isolierte Oxydoredukase (Perhydridase) zusetzte, die mir in liebenswürdiger Weise von Herrn *D. M. Michlin* zur Verfügung gestellt wurde. Unter diesen Bedingungen wird das während einer Minute gebildete Pigment binnen einer Stunde wieder zum Chromogen reduziert. Es ist mir aber bisher nicht gelungen, auf diese Weise den Unterschied in der Geschwindigkeit der Reduktion und Oxydation des Chromogens völlig auszugleichen.

Gleichzeitig mit der Reduktion des Pigments findet die Oxydation von Glykokoll statt. Mit welcher Geschwindigkeit dieser Prozeß vor sich geht, ist aus der Menge des in den Lösungen entstehenden Ammoniaks und der unverändert gebliebenen Aminosäure ersichtlich. Bei jeder minutenlangen Oxydation und nachfolgender Reduktion spalten 20 ccm der Lösung 0,2 mg. Stickstoff ab. Bei der beschriebenen Versuchsanordnung bleibt diese Geschwindigkeit ziemlich konstant. Als Beispiel seien folgende Versuche angeführt.

Versuch 1.

Das Gemisch enthielt auf je 5 ccm Glykokollösung 10 ccm Chlorogensäurelösung (0,1 g pro 50 ccm), 1 ccm Extrakt, 1 ccm Perhydridase und 3 ccm Phosphatlösung. $p_H = 7,8$. Als Antisepticum wurde Toluol zugesetzt. Temperatur = 18° C.

Am ersten Tage wurde die Lösung fünfmal geschüttelt. 1,1 mg[1]) Stickstoff abgespalten.

Am zweiten Tage wurde die Lösung viermal geschüttelt. Weitere 0,9 mg Stickstoff abgespalten.

Am dritten Tage wurde die Lösung viermal geschüttelt. Weitere 0,8 mg Stickstoff abgespalten.

Am vierten Tage wurde die Lösung zweimal geschüttelt. Weitere 0,4 mg Stickstoff abgespalten.

Am fünften Tage wurde die Lösung einmal geschüttelt. Weitere 0,2 mg Stickstoff abgespalten.

Im ganzen wurde 16mal geschüttelt. 3,4 mg Stickstoff abgespalten.

---

[1]) Überall auf 20 ccm Lösung berechnet.

Versuch 2.

Das gleiche Versuchsgemisch wie in Versuch 1, aber Perhydridase durch Wasser ersetzt.

Am ersten Tage wurde die Lösung dreimal geschüttelt. 0,8 mg Stickstoff abgespalten.

Am zweiten Tage wurde die Lösung zweimal geschüttelt. Weitere 0,3 mg Stickstoff abgespalten.

Am dritten Tage wurde die Lösung zweimal geschüttelt. Weitere 0,4 mg Stickstoff abgespalten.

Am vierten Tage wurde die Lösung einmal geschüttelt. Weitere 0,2 mg Stickstoff abgespalten.

Am	fünften Tage wurde die Lösung einmal geschüttelt.	Weitere 0,9 mg Stickstoff abgespalten.
„	sechsten „ „ „ „ „ „	
„	siebenten „ „ „ „ „ „	
„	achten „ „ „ „ „ „	

Im ganzen wurde 12 mal geschüttelt. 2,6 mg Stickstoff abgespalten.

Versuch 3.

Dieselbe Lösung wie in Versuch 2. Am ersten Tage wurde die Lösung zweimal geschüttelt und dann 10 Tage ohne Luftzutritt stehengelassen. Die abgespaltene Stickstoffmenge betrug 0,3 mg.

Berücksichtigt man, daß im Versuch 1 die Lösung im ganzen 16 Minuten und im Versuch 2 12 Minuten lang mit Luft in Berührung kam, so ergibt sich, daß die Oxydation des Glykokolls unter diesen Bedingungen mit außerordentlich großer Geschwindigkeit erfolgt. (In 16 Minuten hatten 20 ccm der Lösung 5,4 ccm O_2 absorbiert.)

Das beschriebene System aus Oxydase, Chlorogensäure und Oxydoredukase ist als ein natürliches Atmungsmodell anzusehen. Freilich ist es noch sehr unvollkommen und arbeitet noch nicht mit hinreichender Gleichmäßigkeit, es bietet aber den Vorzug, aus isolierten Bestandteilen der Zelle zu bestehen.

IX. Die Ursache des Aufhörens der aeroben Atmung bei der Zerstörung der Zellstruktur.

Wie aus dem Vorangehenden ersichtlich, gestaltet sich das Verhältnis zwischen der Oxydationsgeschwindigkeit und der Reduktionsgeschwindigkeit in den von mir angewendeten Lösungen zugunsten des Oxydationsprozesses.

Wird die in Versuch 2 verwendete Lösung in einem flachen Gefäß an der Luft stehengelassen, oder mit Luft geschüttelt, so kann man beobachten, daß sie sehr bald ihre grüne Farbe verliert und braun wird. Aufeinanderfolgende Analysen der Lösung zeigen, daß die Oxydation des Glykokolls anfangs sehr stürmisch verläuft, nach Verlauf von 2 bis 3 Stunden aber bereits zu völligem Stillstand kommt.

Zeit in Stunden:	1/2	1	2	3	6
Stickstoff in mg	1,1	1,8	2,2	2,4	2,4

Bei dem Aufhören der Oxydation des Glykokolls spielt das Verschwinden des Atmungspigments die Hauptrolle.

Wird z. B. eine Mischung von Chlorogensäurelösung und Extrakt zunächst 6 bis 12 Stunden an der Luft stehengelassen und dann mit Glykokoll vermischt, so erfolgt keine Abnahme des Aminostickstoffs und keine Ammoniakbildung. Wird zur Herstellung der Lösungen mit Sauerstoff gesättigtes Wasser verwendet und der ganze Versuch unter energischem Schütteln der Flüssigkeit ausgeführt, so kommt die Oxydation des Glykokolls nach kurzem Aufschwung rasch (in 2 bis 3 Minuten) zum Stillstand. In evakuierten und zugeschmolzenen Ampullen aufbewahrt, behält dagegen das Gemisch alle seine Eigenschaften während einer Woche und mehr. Nach Öffnen der Ampulle verläuft die Oxydation fast genau so wie in frisch dargestellten Lösungen.

Das Verhältnis zwischen Oxydase und Redukase in dem von mir verwendeten Extrakt gestaltete sich derartig, daß die Oxydation bei freiem Luftzutritt infolge des Übergangs des Atmungspigments in eine stabile Verbindung (das braune Pigment) nicht längere Zeit fortdauern konnte. Es liegt kein Grund zur Annahme vor, daß in der unversehrten, lebenden Pflanzenzelle ein anderes quantitatives Verhältnis zwischen den erwähnten Fermenten bestehe. In der lebenden Zelle verlaufen aber die Oxydationsprozesse überaus gleichmäßig, und es entsteht dort normalerweise kein braunes Pigment. Die Oxydations- und Reduktionsvorgänge in der lebenden Zelle befinden sich daher im Gleichgewichtszustand. Auf welche Weise dieser Gleichgewichtszustand erzielt wird, ist vorerst noch nicht klar. Am nächsten liegt die Vermutung, daß die Erscheinungen der Protoplasmapermeabilität hier mitspielen. Wird die Integrität der Zelle, z. B. durch mechanische Verletzung, gestört, so nehmen die Oxydationsprozesse über die Reduktionsprozesse überhand. Es erfolgt dieselbe Erscheinung, die bei der energischen Oxydation meiner Gemische beobachtet wurde. Hier wie dort findet zunächst eine explosionsähnliche Erhöhung der Oxydationsintensität statt, worauf die Oxydation rasch abnimmt und zum Stillstand kommt. Gleichzeitig erscheint sowohl in dem Gemisch als in der geschädigten Pflanzenzelle das dunkelbraune Pigment. Diese Pigmentbildung ist mit dem Stillstand der aeroben Atmung aufs engste verknüpft.

W. Palladin hat im Zusammenhang mit seinen Versuchen über das Erfrieren von Pflanzenkeimen und Blättern darauf hingewiesen, daß das Auftreten der braunen Färbung das sicherste Zeichen des Absterbens der Pflanze ist. Man kann im voraus sicher sein, daß solche dunkel gewordenen Pflanzen nicht mehr auf normale Weise atmen können.

Der gleiche Effekt wird bei der Erhöhung des Partialdrucks des Sauerstoffs in der die Pflanze umgebenden Atmosphäre beobachtet. Nach kurzdauernder Zunahme der Atmungsintensität hört die Pflanze auf zu atmen. Als ich zu solchen Versuchen ätiolierte Sonnenblumenkeimlinge benutzte, konnte ich die Bildung des charakteristischen braunen Pigments beobachten.

Unter dem Einfluß der Narkotica erfährt die Permeabilität des Protoplasmas bekanntlich tiefgreifende Veränderungen. In dieser Hinsicht wirken die Narkotica fast ebenso wie das Erfrieren oder sogar die mechanische Zerstörung der Zelle. Deswegen hat auch die Wirkung der Narkotica dieselben Folgen wie die erwähnten Eingriffe. Die Pflanzenzelle beginnt erst intensiver zu atmen, dann treten braune Pigmente auf und die Atmung steht still.

Alle eingangs beschriebenen Erscheinungen der Atmungsstimulierung sind einander eben deshalb ähnlich weil ihnen ein und dieselbe Ursache, nämlich der Zutritt überschüssigen Sauerstoffs ins Innere der Zelle, zugrunde liegt. Infolgedessen wird das Gleichgewicht zwischen den Oxydations- und Reduktionsvorgängen gestört. Zunächst hat dies eine Erhöhung der Atmungsintensität zur Folge, dann aber hört die Atmung wegen der Zerstörung des Chromogens auf.

Vorliegende Untersuchungen können natürlich noch nicht als abgeschlossen angesehen werden. Auf Grund der hier mitgeteilten Ergebnisse glaube ich aber zu folgenden *Schlüssen* berechtigt zu sein.

1. Die in der lebenden Zelle stattfindende aeröbe Atmung besteht aus zwei Hauptmomenten, erstens der Oxydation eines Atmungschromogens durch den Luftsauerstoff zum Pigment, unter dem Einfluß der Phenoloxydase, und zweitens der Reduktion des Pigments zum ursprünglichen Chromogen, unter dem Einfluß der Oxydoredukase. Letzterer Vorgang vollzieht sich auf Kosten des Wasserstoffs des Wassers, während das Hydroxyl des Wassers von den Atmungsmaterialien der Zelle aufgenommen wird.

2. Für den gleichmäßigen Verlauf der Oxydation ist von wesentlicher Bedeutung, daß zwischen beiden genannten Vorgängen ein gewisses Gleichgewicht bestehe.

3. Bei erhöhter Sauerstoffabsorption, infolge mechanischer oder chemischer Beeinträchtigung der Integrität an Zellen, kommt der Prozeß der aeroben Atmung wegen der Umwandlung des Atmungschromogens durch tiefgehende Oxydation in inaktives Pigment zum Stillstand.

Es ist mir eine angenehme Pflicht, zum Schluß Herrn Prof. *A. Bach* für den stetigen Beistand, den er mir bei der Ausführung dieser Arbeit gewährte, meinen tiefsten Dank auszusprechen.

Literatur.

1) *S. Kostytschew*, Untersuchung über die anaerobe Atmung der Pflanze. 1907 (russisch). — 2) *Zalesky* und *Reinhard*, diese Zeitschr. **27**, 450, 1910; **35**, 228, 1911. — 3) *L. Iwanoff*, ebendaselbst **25**, 171, 1910; Ber. d. Deutsch. bot. Ges. **29**, 563, 622. — 4) *I. Bodnar* und *P. Hoffner*, diese Zeitschr. **165**, 145, 1925. — 5) *W. Zalesky*, ebendaselbst **31**, 195, 1911. — 6) *O. Warburg*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **59**, 112, 1909; **69**, 452, 1911; **70**, 413, 1911; Pflügers Arch. **145**, 277, 1912; **148**, 295, 1912; **158**, 190, 1914. — 7) *Derselbe*, Zeitschr. f. Elektrochem. **28**, 70, 1922. — 8) *O. Warburg* und *W. Brefeld*, diese Zeitschr. **145**, 461, 1924; *O. Warburg*, ebendaselbst **152**, 479, 1924. — 9) *O. Warburg*, ebendaselbst **152**, 488, 1924. — 10) *Derselbe*, ebendaselbst **152**, 491, 1924. — 11) *C. Oppenheimer*, Die Fermente, II, S. 1254. — 12) *Elfring*, Ofversigt of Finska Vet. Soc. **28**, 1886; *Johanssen*, Bot. Centralbl. **68**, 337, 1896; *N. Morkowin*, Rev. génér. de bot. **11**, 289, 1899; **13**, 109, 1901; Die Wirkung anästhesierender Substanzen auf Pflanzen. Warschau 1901 (russisch); *A. Irving*, Ann. of Bot. **25**, 1077, 1911; *G. Thody*, ebendaselbst **27**, 697, 1912; *Haas*, Bot. gas. **67**, 347, 1919. — 13) *B. Jacobi*, Flora **86**, 289, 1899; *W. Zaleski*, Zur Frage der Wirkung von Reizen auf die Pflanzenatmung. 1902 (russisch). — 14) *Boehm*, Bot. Ztg. **45**, 671, 1887; *Stich*, Flora **74** 1, 1891; *Smirnoff*, Rev. génér. de bot. **15**, 26, 1903; *Richards*, Ann. of Bot. **10**, 531, 1896; **11**, 29, 1897; *W. Zaleski*, Ber. d. Deutsch. bot. Ges. **19**, 331, 1901; *Krasnoselska*, ebendaselbst **24**, 134, 1906. — 15) *Cl. Bernard*, „Vorlesungen über die Lebenserscheinungen" 1870; *I. Borodin*, Bot. Ztg. **39**, 127, 1881; *Deroin* et *Landrin*, C. r. **78**, 1488, 1874; *Johanssen*, Unters. a. d. bot. Inst. Tübingen **1**, 686, 1885. — 16) *A. Bach*, Chemismus der Atmungsprozesse. Journ. d. russ. physiko-chem. Ges. **44**, 2. Lief., 1912 (russisch). Oxydationsprozesse in der lebenden Substanz. Oppenheimers Handb. d. Biochem., Ergänzungsband **1913**, S. 133. — 17) *W. Palladin*, Ber. d. Deutsch. bot. Ges. **30**, 104, 1912; Zeitschr. f. Gärungsphysiol. **1**, 91, **1912**. — 18) *A. Oparin*, diese Zeitschr. **124**, 90, 1921. — 19) *H. Kniep*, Intern. Revue d. ges. Hydrobiol. u. Hydrograph. **7**, 5, 1914. — 20) *A. Lieben*, Monatsh. f. Chem. **16**, 218, 1895. — 21) *H. Wieland* und *F. Bergel*, Liebigs Ann. d. Chem. **439**, 196, 1924. — 22) *A. Bach*, Moniteur scientifique (4) **11**, 479. — 23) *W. Manchot*, Liebigs Ann. d. Chem. **314**, 177, 1901. — 24) *H. Wieland* und *F. Fischer*, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Nr. 6, S. 1180, 1926. — 25) *H. D. Dakin*, Journ. of biol. Chem. **1**, 171, 1906; **4**, 63, 1909. — 26) *A. Bach* und *A. Oparin*, diese Zeitschr. **134**, 183, 1922.

Zur Kenntnis des Mechanismus der Immunitätserscheinungen.

III. Mitteilung:

Über den Einfluß einiger Aminosäuren auf die Wirkung des Tetanustoxins.

Von

B. Sbarsky und Z. Jermoljewa.

(Aus dem Biochemischen Institut des Kommissariats für Volksgesundheit in Moskau.)

(Eingegangen am 17. Januar 1927.)

In ihren Arbeiten über die Adsorption der Aminosäuren und des Diphtherietoxins durch die roten Blutkörperchen haben *Sbarsky* (1) und *Subkowa* (2) unter anderem auch den Einfluß einiger Aminosäuren auf die Wirkung des Diphtherietoxins untersucht.

Die genannten Autoren haben festgestellt, daß ein Gemisch von Diphtherietoxin mit kleinen Mengen Tyrosins für Meerschweinchen bei subkutaner Injektion vollständig atoxisch ist. Ähnliche Versuche mit Glykokoll ergaben ein Überleben der Meerschweinchen im Durchschnitt um 5 Tage im Vergleich zu den Kontrolltieren; wurde dem Toxin Alanin zugesetzt, so überlebten die Tiere die Kontrolle um 2 Tage. Leucin blieb dagegen wirkungslos.

Es war von Interesse, den Einfluß derselben Aminosäuren auf die Wirkung des Tetanustoxins zu prüfen. Wir hatten trockenes Tetanustoxin zur Verfügung, das uns von Herrn Prof. *S. W. Korschun* in liebenswürdiger Weise überlassen wurde.

Die tödliche Dosis dieses Toxins für eine 20 g wiegende Maus betrug 0,00001. Zu unseren Versuchen wurden reine Aminosäurenpräparate (Tyrosin, Alanin, Asparagin, Glykokoll, Leucin) der Firma *Kahlbaum* verwendet.

Es wurde vor allem die Wirkung der reinen Aminosäuren auf die Mäuse geprüft. Es stellte sich heraus, daß Alanin, Tyrosin, Asparagin und Leucin in Dosen von 0,01 bis 0,05 durch etwa 20 g wiegende Tiere

ohne Folgen vertragen wurden, abgesehen von einer unbedeutenden Lokalreaktion nach der Injektion von Tyrosin.

Die Versuche wurden auf folgende Weise ausgeführt:

Es wurden Lösungen der Aminosäuren und des Tetanustoxins von solcher Konzentration hergestellt, daß nach der Mischung der Lösungen 2 ccm des Gemisches eine tödliche Dosis des Toxins und eine bestimmte Menge der Aminosäure enthielten. Bei den Versuchen mit Tyrosin mußten infolge der geringen Löslichkeit dieser Aminosäure durch sorgfältiges Verreiben in der Reibeschale hergestellte wässerige Suspensionen verwendet werden.

Die Mischung aus Aminosäure und Tetanustoxin wurde 1 Stunde, in einigen Versuchen aber 5 Tage lang im Thermostaten stehengelassen und alsdann den Mäusen zu je 2, 4 usw. ccm, d. h. je 1, 2 usw. tödliche Dosen subkutan injiziert. Die Kontrolltiere erhielten nur eine tödliche Dosis Toxin. Die Versuche wurden in Serien zu 20 bis 30 Mäusen ausgeführt, von denen zwei als Kontrolle dienten. Im ganzen wurden 132 Versuche ausgeführt.

Tabelle I.

Aminosäure	Menge des Tyrosins	Zahl Dlm. des Tetanustoxins	Bis zur Einführung stand das Gemisch im Thermostaten	Menge der Versuchstiere	Zahl der überlebenden Tiere	Proz.	Auf wieviel Tage
Tyrosin	0,01	1	1 Stunde	20	20	100	∞
		2		10	10	100	9 ∞
		5		4	0	0	0
		2	5 Tage	5	5	100	∞
		5		5	5	100	∞
		10		3	0	0	0
Glykokoll	0,05	1	1 Stunde	8	0	0	0
		2		2	0	0	0
	0,01	1	5 Tage	5	0	0	0
		2		5	0	0	0
Leucin	0,05	1	1 Stunde	7	0	0	0
Alanin	0,05	1	1 „	7	2		5
		2		2	0	0	0
Asparagin	0,05	1	1 „	5	0	0	0

*) 0 = überstanden nicht.
**) ∞ = überstanden.

Die Versuchsergebnisse sind in Tabelle I zusammengestellt. Wie aus dieser Tabelle ersichtlich, wurden mit Leucin, Glykokoll und Asparagin durchweg negative Resultate erhalten.

Die Wirkung des Alanins war ebenfalls unbedeutend, obwohl die Versuchstiere in einigen Fällen die Kontrolle um 5 Tage überlebten. Außerordentlich günstige Resultate wurden mit Tyrosin erzielt.

Durch Zusatz von Tyrosin in Dosen von 0,01 wurde eine Letaldosis des Toxins vollständig entgiftet. Subkutane Injektion des Gemisches

rief nur ein unbedeutendes entzündliches Ödem hervor. Das aus Plasma und Leucocyten bestehende Ödem bildete sich langsam zurück, und nach 6 bis 8 Tagen verblieb nichts als ein kleines, subkutanes Knötchen, das bald verschwand oder in vereinzelten Fällen in einen aseptischen Abszeß überging.

Die Wirkung dieser Dosis (0,01) Tyrosins hört bei 5 Dlm Tetanustoxin auf. Bei 5 Dlm bleibt sogar der Zusatz von fünffachen Mengen Tyrosins (0,05 g) wirkungslos, während zur Entgiftung von vier letalen Toxindosen schon 0,01 g Tyrosin genügt. Diese eigentümliche Erscheinung wurde bereits bei den Versuchen mit Diphtherietoxin beobachtet (unveröffentlichte Untersuchungen unseres Instituts); das Studium des Phänomens wird fortgeführt. Recht interessant ist auch folgende Beobachtung. Wird das Gemisch von Tetanustoxin und Tyrosin filtriert, Filtrat und Niederschlag den Versuchstieren getrennt injiziert, so erweisen sich beide Anteile als vollständig inaktiv.

Bei fünftägigem Aufenthalt des Gemisches im Thermostaten wird es auch bei kleinen Tyrosindosen atoxisch.

Die Kontrolle (reines Toxin) behält bei fünftägigem Stehen im Thermostaten ihre Eigenschaften. Die Annahme, daß der inaktivierende Einfluß des Tyrosins auf das Tetanustoxin durch Veränderung des p_H bewirkt sein könnte (demgegenüber das Toxin bekanntlich sehr empfindlich ist), bestätigt sich nicht. Bestimmungen des p_H ergaben, daß die p_H-Werte während der ganzen Dauer des Aufenthalts im Thermostaten sowohl im Tyrosin-Toxingemisch (zur Bestimmung mußte filtriert werden) als im reinen Tetanustoxin nur zwischen 6,7 und 6,9 schwankten. Folglich kann in diesem Falle von einer Wirkung der Veränderung des p_H nicht die Rede sein.

Es schien von Interesse, den Einfluß des Tyrosins auf das Tetanustoxin bei getrennter Einführung in den Organismus zu erforschen. Es wurden Versuche an 20 Mäusen ausgeführt, bei denen Toxin und Tyrosin zur gleichen Zeit, aber getrennt, in verschiedenen Körperhälften der Versuchstiere injiziert wurden. Das Resultat der Versuche war negativ: die Tiere gingen fast gleichzeitig mit der Kontrolle zugrunde.

Aus den Resultaten ist ersichtlich, daß das Tyrosin bei unseren Versuchen dem Tetanustoxin gegenüber dieselbe Rolle spielte, wie das Formol in den Versuchen von *Löwenstein*, *Eisler*, *Sordelli* und *Descombey* (3), das Chinin bei *Marie* (4), das Ozon und das Natriumoleinat bei *Nelis* (5), die Milch bei *Joannidès* (6), der Agar bei *Minkewicz* und *Zuckermann* (7), das Tapioka bei *Ramon* und *Descombey* (8).

Von großer Bedeutung ist der Umstand, daß das Tyrosin auf Tetanustoxin dieselbe neutralisierende Wirkung ausübt wie auf Diphtherietoxin. Diese Erscheinung beruht nach *Sbarsky* darauf, daß

die von den Erythrocyten adsorbierten Aminosäuren die Adsorption des Toxins verhindern. Unbegreiflich bleibt aber, weshalb das Toxin mit Tyrosin, zur gleichen Zeit, aber davon getrennt, in verschiedene Körperteile injiziert, seine Toxidität behält. Die Ursache könnte allerdings in der langsamen Resorption des Tyrosins liegen, infolgederen das Tyrosin die Erythrocyten erst später erreichen kann.

Die erzielten Resultate veranlaßten uns, auch die prophylaktische Wirkung des Tyrosins zu untersuchen.

Eine Reihe von 25 Mäusen erhielt eine einmalige Injektion von je 0,05 g Tyrosin subkutan, eine andere Reihe (30 Mäuse) vier Tyrosininjektionen in dreitägigen Intervallen, in zunehmenden Dosen von 0,01 bis 0,05 g.

Tabelle II.

Dosis	Wievielmal eingeführt	Zahl Dlm	An welchem Tage nach der letzten Aminosäureinjektion wurde Tetanustoxin eingeführt?						
			1	2	3	5	7	10	20
0,05 g Tyrosin	1	1	0	0	∞	∞	∞	∞	0
		2	0	0	0	∞	∞	0	0
0,16 g „	4	1	0	0	∞	∞	∞	∞	0
		2	0	0	∞	∞	∞	∞	0
0,05 g Leucin	1	1	0	∞	∞	∞	∞	0	
		2	0		∞				
0,1 g Glykokoll	1	1			0				
		2							
10 ccm physiol. Kochsalzlösung				0		0	0		
10 „ destill. Wasser				0		0			

0 = überstanden nicht.
∞ = überstanden.

Aus den Resultaten dieser Versuche (Tabelle II) geht hervor, daß die prophylaktische Wirkung des Tyrosins gleich Null war, wenn zwischen der Tyrosininjektion und der Injektion von Tetanustoxin nicht mehr als 2 Tage verstrichen. Mit Zunahme des Zeitraums zwischen Tyrosin- und Toxininjektionen ändert sich das Bild.

Vom dritten bis zum zehnten Tage nach der letzten Tyrosininjektion, bei den Versuchen mit einmaliger Injektion, und vom dritten bis zum fünfzehnten Tage, bei denen mit wiederholten Tyrosineinspritzungen, sind die Tiere imstande, der Wirkung einer und in einigen Fällen sogar zweier Tetanusdosen des Toxins zu wiederstehen.

Wird das Intervall zwischen den Injektionen von Tyrosin und Toxin bis auf 20 Tage ausgedehnt, so ist das Tier unfähig, sogar die einfache tödliche Dosis zu ertragen.

Ähnliche Versuche wurden mit Leucin, Asparagin und Glykokoll angestellt. Desgleichen wurde zur Kontrolle die Resistenz der Tiere nach Injektion von 10 ccm destillierten Wassers oder physiologischer Kochsalzlösung geprüft. Es stellte sich heraus, daß von allen erwähnten Substanzen nur Leucin gewisse prophylaktische Eigenschaften aufweist. Betrug z. B. das Intervall zwischen der Leucininjektion und der Toxineinspritzung 3 bis 5 Tage, so war das Tier imstande, die Wirkung der einfachen Letaldosis zu überstehen. Die Versuche mit Asparagin und Glykokoll, destilliertem Wasser und physiologischer Lösung ergaben negative Resultate. Auch in diesen Versuchen erwies sich also das Tyrosin als die wirksamste aller angewendeten Aminosäuren.

Es wurde auch die prophylaktische Wirkung peroraler Verabreichung von Tyrosin untersucht.

Da es mit Schwierigkeiten verbunden war, Mäusen Tyrosin per os einzuführen, wurden zu diesen Versuchen Meerschweinchen verwendet. Es wurden während 10 Tagen je 0,1 g Tyrosin in wässeriger Suspension täglich an 15 Meerschweinchen verfüttert. Alle Tiere wiesen sogar der einfachen Letaldosis des Tetanustoxins gegenüber kleine Resistenz auf, abgesehen von der Dauer der Zeitspanne zwischen der letzten Tyrosingabe und der Toxininjektion.

Auf diese Weise haben wir es beim Tyrosin sicher, in gewissem Maße aber auch beim Leucin mit Substanzen zu tun, die eine prophylaktische Wirkung gegenüber dem Tetanustoxin aufweisen. Diese Erscheinung kann befriedigend vom Standpunkt der Hypothese *Sbarskys* erklärt werden; denn das prophylaktisch injizierte Tyrosin konnte in den Versuchen Depots bilden, aus denen es nach und nach in das Blut überging und dabei die Erythrocyten vor der Adsorption des später injizierten Tetanustoxins schützte. Man könnte aber die prophylaktische Rolle des Tyrosins auch vom Standpunkt der „Proteintherapie" betrachten. In den neuen Versuchen von *Métalnikoff* (9) konnte durch indifferente Substanzen, z. B. durch Albumin, Zucker oder Stärke, eine mehr oder minder intensive Reaktion von seiten verschiedener Körperzellen hervorgerufen werden. Die Reaktion ist fast immer entzündlicher Art. Sie besteht in einer Anhäufung von Polynucleären, Monocyten, Makrophagen und Lymphocyten und hält gewöhnlich 10 bis 15 Tage nach der Injektion an. Mit solchen Abwehrmitteln bewaffnet, ist der Organismus imstande, der schädlichen Wirkung des Toxins Widerstand zu leisten.

Es blieb die Frage offen, ob die antigenen Eigenschaften des Gemisches aus Tetanustoxin und Tyrosin nach der Entgiftung erhalten blieben, wie es in den Versuchen von *Ramon*, *Nelis*, *Descombey*, *Marie* der Fall war.



Versuche, die zu diesem Zwecke von uns ausgeführt wurden, ergaben positive Resultate.

40 Mäuse wurden mit „Tyrosin-Toxin“ immunisiert. 2 Wochen nach der letzten Injektion erhielten fünf Mäuse je fünf Dlm. und fünf Mäuse je zehn tödliche Toxindosen. Die Tiere, die fünf Dosen erhalten hatten, blieben am Leben, während diejenigen, denen zehn Letaldosen injiziert wurden, zugrunde gingen. Einen Monat nach der letzten Injektion erhielten wieder zwei Serien von Mäusen je 5 und 10 Dlm. Tetanustoxin; auch in diesem Falle wurden 5 Dlm. von den Mäusen ohne Schaden ertragen, die Mäuse, die zehn Toxindosen erhielten, blieben am Leben und zwei gingen zugrunde. 1½ Monat nach der letzten Injektion waren die Resultate dieselben. 2 Monate nach der letzten Injektion erhielten wieder zwei Serien von Mäusen je 5 und 10 Dlm., alle Tiere blieben am Leben (Tabelle III).

Tabelle III.

Zahl der Mäuse	Zahl Dlm.	Während wie vieler Tage nach d. letzten Injektion wurde Tetanustoxin eingeführt?	Zahl der Überlebenden
5	5	14	∞
5	10	14	0
5	5	30	∞
5	10	30	{ 4 ∞ 1—5
5	5	45	∞
5	10	45	0
5	5	60	{ 4 ∞ 1—10
5	10	60	∞

0 = überstanden nicht.
∞ = überstanden.

Aus den Ergebnissen ist ersichtlich, daß die antigenen Eigenschaften des „Tyrosintoxins“ zwar erhalten geblieben sind, aber eine gewisse Abschwächung erfahren haben, denn die völlige Unempfindlichkeit tritt erst 2 Monate nach der Immunisierung ein, wie bei der Immunisierung durch mit Natriumoleinat oder Ozon vorbehandeltes Toxin (in den Versuchen von *Nelis* nach 76 Tagen) kann das „Tyrosintoxin“ zu den Anatoxinen gerechnet werden. Nach *Ramon* müssen letztere folgenden Anforderungen genügen: 1. atoxisch sein, 2. antigene Eigenschaften besitzen, 3. in der Gegenwart von Antitoxin ausflocken. Wie aus unseren Ergebnissen ersichtlich, erfüllt das Tyrosintoxin die beiden ersten Bedingungen. Es blieb zu ermitteln, ob es die Flockungsreaktion gibt.

Von sieben aus dem Blute immuner Mäuse hergestellten Proben ergaben sechs mit zuvor filtriertem Tyrosintoxin eine Trübung, aber keine Flockung. Für drei Sera wurde beginnende Trübung nach drei-

stündigem Aufenthalt im Thermostaten bei Dosen von 0,6 festgestellt. Zwei Sera trübten sich bei der Dosis 0,7 und zwei bei 0,5.

Mit Tetanustoxin, das nicht mit Tyrosin behandelt wurde, trübten sich die Sera erst nach sechsstündigem Aufenthalt im Thermostaten, und die Trübungszone war viel enger begrenzt.

Die Trübungsproben wurden Meerschweinchen in Dosen von 1 ccm injiziert. Die Injektion wurde von den Tieren ohne schädliche Folgen ertragen, was auf die vollständige Entgiftung der Proben hinweist. Ist die Zeit und die Stärke der Flockung wirklich als Kennzeichen der Antigenstärke anzusehen, so muß die Stärke des „Tyrosinantigens" als ungenügend beurteilt werden. Welcher Art der Mechanismus der Tyrosinwirkung in diesem Falle ist, bleibt ungeklärt. Die Frage ist um so schwieriger zu entscheiden, als es keine einfache Aufgabe ist, das Tyrosintoxin vollständig von Tyrosin zu befreien und wieder reines Toxin zu erhalten, wie dies in den Versuchen mit Chinin oder Tapioka ohne Mühe gelingt.

Es wäre möglich, daß der Zusatz von Tyrosin zum Toxin in ähnlicher Weise wie der Zusatz von Agar in den Versuchen von *Minkewicz* und *Zuckermann* mit dem Tetanustoxin wirkt, unter Bildung von Depots, aus denen es langsam und allmählich resorbiert wird. Oder es wirkt wie das entzündliche Reaktion hervorrufende Tapioka, das nach der Anschauung von *Nelis* den Organismus zwingt, alle seine Abwehrkräfte minimalen Toxinmengen gegenüber zu konzentrieren. Oder die Wirkung ist chemischer Art, wie die des Formols im Anatoxin von *Ramon*. Oder das Tyrosin wird, nach der Hypothese von *Sbarsky*, von Erythrocyten adsorbiert und verhindert bei Adsorption des Toxins, wie dies in den Versuchen von *Sbarsky* und *Subkowa* mit Diphtherietoxin der Fall war.

Die Analogie mit den Versuchen von *Sbarsky* und *Subkowa* über das Diphtherietoxin ließ die letzte Erklärung besonders plausibel erscheinen. Aus unseren Versuchen, die demnächst veröffentlicht werden sollen, erhellt aber, daß weder die Erythrocyten von empfänglichen Tieren (Meerschweinchen, Mäusen), noch die von immunen Spezien (Hühner), das Tetanustoxin zu adsorbieren imstande sind. In diesem Falle ist es das Nervengewebe, dem die dominierende Rolle gehört.

Die Ergebnisse unserer Versuche können in nachstehenden Schlußsätzen zusammengefaßt werden.

1. Ein Gemisch aus Tetanustoxin und kleinen Mengen Tyrosin ist für Mäuse und Meerschweinchen bei subkutaner Injektion atoxisch.

2. Ähnliche Versuche mit anderen Aminosäuren (Leucin, Asparagin, Glykokoll) führen zu negativen Ergebnissen.

3. Es läßt sich eine prophylaktische Wirkung von Tyrosin (und zum Teil auch von Leucin) nachweisen.

4. „Tyrosintetanustoxin" besitzt allem Anschein nach die Eigenschaften eines Anatoxins, es ist 1. atoxisch, besitzt 2. antigene Eigenschaften und gibt 3. mit Antiserum eine schwache Flockungsreaktion.

5. Die Immunität nach Einführung von „Tyrosintetanustoxin" tritt 2 Monate nach der letzten Injektion ein.

Literatur.

1) *B. Sbarsky*, diese Zeitschr. **185**, 21, 1923. — 2) *B. Sbarsky* und *L. Subkowa*, ebendaselbst **172**, 40, 1925. — 3) *Descombey*, Ann. de l'Inst. Pasteur **6**, 1925. — 4) *Marie*, C. r. 1913. — 5) *Nelis*, C. r. Soc. de biol. **14**, 1925. — 6) *Joannidés*, ebendaselbst **33**, 1925. — 7) *Minkewitsch* und *Zuckermann*, Prophilakt. Medic. 1925. — 8) *Ramon* und *Descombey*, C. r. Soc. de biol. **29**, 1925; **26**, 1925. — 9) *Métalnikoff* und *V. Sekreteva*, C. r. **4**, 1926.

Über die Einwirkung der Narkose auf die chemische Zusammensetzung des Gehirns.

(Vorläufige Mitteilung.)

Von

M. Serejski (Moskau).

(Aus dem Forschungsinstitut für höhere Nerventätigkeit.)

(Eingegangen am 17. Januar 1927.)

Das Problem der Erregung und Hemmung gilt als Grundproblem der modernen Physiologie. Hierher gehört auch die Frage der Einwirkung der Narkotica auf das Zentralnervensystem, die zwar mehrmals in der Literatur behandelt wurde, aber dessenungeachtet keinesfalls als eindeutig gelöst erscheint. In unseren Versuchen hielten wir es für unumgänglich, die der Narkose vorangehende Erregungsphase möglichst zu verkürzen, da man sonst mit Interferenz beider Phasen rechnen muß. Nach vielen Vorversuchen wählten wir folgendes Verfahren: die Versuchstiere erhielten subkutan Morphium hydr. (1 Proz.) (1,5 ccm auf 1 kg Körpergewicht), daraufhin — nach 20 Minuten — etwa 10,0 ccm Chloroform. Es schien uns ferner von Belang, das Benehmen der Tiere während des Versuchs, was zweifellos die chemische Zusammensetzung des Hirns beeinflussen könnte, im Auge zu halten. Als Indikatoren dieses Verhaltens benutzten wir die Bestimmung der Blutkatalase und des Blutzuckers zu verschiedenen Zeiten des Versuchs. Die Bestimmung der Katalase, wie wir übrigens erwarteten, stellte sich als zwecklos heraus. Die anspruchsvolle Theorie von *Burge*[1]), der die Katalase als Gradmesser der Intensität der Lebensprozesse bezeichnet, hat sich als völlig unhaltbar erwiesen. Wir können die durch *Burge* beobachtete Beziehung zwischen Katalaseindex und Gemütsbewegungen nicht

---

[1]) Amer. Journ. of Phys. 1917.



bestätigen. Die recht geringen Katalaseschwankungen findet man regelmäßig bei jedem Individuum (*Bach*).

Der experimentelle Teil unserer Arbeit wurde in Gemeinschaft mit *A. Revo* und *R. Topstein* ausgeführt und erscheint demnächst ausführlich. Als Versuchstiere galten Hunde. Die Narkose dauerte ½ bis 1½ Stunden an. Die Tiere wurden in der Narkose durch Entbluten aus der Art. carotis getötet und das Hirn sofort bearbeitet. Die große Bedeutung, die in den letzten Jahren dem subkortikalen Gebiet zugeschrieben wird, zwang uns, die Untersuchung sowohl der Hirnrinde wie auch der weißen Substanz zu unternehmen. Wir berücksichtigten dabei gleichzeitig die Eiweißstoffe und die Lipoide, da uns die Beweisgründe derjenigen Autoren, die nur die Eiweißkörper oder nur die Lipoide als Träger des Lebens betrachten, als gleich unberechtigt schienen. Solch eine vielseitige Untersuchung des Gehirns, das beim Hunde im ganzen 70 bis 80 g ausmacht, war lediglich mit der Mikromethode auszuführen. Wir verdanken *Gorodissky*[1]), die *Fränkel-Bang*sche Methode der Lipoidbestimmungen als Mikromethode zur Hirnuntersuchung ausgearbeitet zu haben. Diese Methode benutzten auch wir unter ganz geringen Veränderungen. Den Gesamtstickstoff bestimmten wir nach *Kjeldahl*, den Aminostickstoff nach *Folin*, den Reststickstoff — nach Fällung durch Natriumwolframat — nach *Kjeldahl*. Für die Bestimmung der Lipoide gebrauchten wir 40 bis 60 mg des Gehirns, für den Stickstoff 80 bis 100 mg. Als großes Hindernis erwiesen sich die bedeutenden Schwankungen der Gehirnzusammensetzung bei verschiedenen Hunden. Wir sahen uns deswegen genötigt, um zuverlässigere „Standardzahlen" zu erhalten, eine größere Zahl Normalgehirne zu untersuchen. Die Resultate dieser Versuche (an 22 Hunden) sowie der Versuche an 12 narkotisierten Hunden werden als Mittelwerte in zwei Tabellen angeführt.

Tabelle I.

	Gesamt-N	Relative Zunahme des Gesamt-N	Amino-N	Relative Zunahme des Amino-N	Rest-N	Relative Zunahme des Rest-N	
	in Prozenten der frischen Substanz						
Normale Hunde . . .	1,67	—	0,055	—	0,21	—	Graue Substanz
Narkotisierte Hunde	1,73	3,6	0,063	1,45	0,31	47,6	
Normale Hunde . . .	1,73	—	0,044	—	0,18	—	Weiße Substanz
Narkotisierte Hunde	1,78	3,5	0,052	1,8	0,36	100,0	

[1]) Diese Zeitschr. 159, 379, 1925.

Tabelle II.

	Gesamt-P	Relat. Zunahme des Gesamt-P	Cholesterin	Relat. Zunahme d. Cholesterins	Phosphor d. ungesättigten Phosphatide	Relat. Zunahme des Phosphors d. ungesättigten Phosphatide	Lipoide des Alkoholauszuges	Relat. Zunahme der Lipoide des Alkoholauszuges	
	in Prozenten der frischen Substanz								
Norm. Hunde .	0,2541	—	1,05	—	0,0866	—	2,39	—	Graue Substanz
Narkot. „ .	0,2883	13,5	1,18	12,3	0,1013	16,9	2,71	13,4	
Norm. „ .	0,4326	—	4,67	—	0,2527	—	4,43	—	Weiße Substanz
Narkot. „ .	0,4825	11,3	5,30	13,4	0,3340	32,1	4,70	6,1	

Aus der ersten Tabelle ist zu entnehmen, daß bei Chloroformeinwirkung eine Erhöhung der Menge des Gesamtstickstoffs sowohl in der grauen als in der weißen Substanz des Gehirns zu vermerken ist. Diese Erhöhung ist allerdings sehr unbedeutend, überschreitet kaum die Fehlergrenze (für die graue Substanz 0,06 Proz., relative Zunahme 3,6 Proz., für die weiße Substanz 0,05 Proz., relative Zunahme 3,5 Proz. Es ist beachtenswert, daß diese Zahlen mit denjenigen anderer Autoren, die mit anderen Versuchstieren und mit anderen Narkotica zu tun hatten und dabei die Totalität des Hirns untersuchten, gut übereinstimmen.

So fand *Soula*[1]) bei Kaninchen eine Erhöhung von 1,540 bis 1,582, d. h. auf 0,042 Proz. Entschiedener ist die Zunahme bei *Waser*[2]) für Veronalhunde, von 1,91 auf 2,61 Proz. Besonders interessant und überzeugend sind die Versuche von *H. Winterstein* und seinen Mitarbeitern. *Winterstein* und *Hirschberg*[3]) zeigten am isolierten überlebenden Hirn des Frosches, daß unter der Äthylalkoholwirkung der Verbrauch stickstoffhaltiger Substanzen während 24 Stunden bis auf 0,06 Proz. der frischen Substanz unterdrückt wird (in der Norm 0,25 Proz.). Analoge Veränderungen sind auch bei Urethannarkose im Kohlenhydratstoffwechsel zu finden[4]). *Hecker*[5]) fand am isolierten Zentralnervensystem des Frosches, bei Urethannarkose, einen Anstieg des Gesamtstickstoffs von 0,1612 auf 0,1848, d. h. auf 0,0236 Proz. Im Widerspruch zu unseren Versuchen stehen die Angaben von *Tscherkes* und *Gorodissky*[6]). In den Versuchen mit Chloroformnarkose bei Kaninchen fanden sie eine starke Abnahme des Gesamtstickstoffs in der Hirnrinde, von 2,21 bis 1,92 Proz. Diese enorm hohen Zahlen für Normalkaninchen (2,21 Proz.) kamen uns sonderbar vor. Die betreffende Zahl für dasselbe Tier beträgt bei *Palladin* und *Bjelajewa*[7]) (aus demselben Laboratorium)·

[1]) C. r. Soc. biol. **78**.
[2]) Zeitschr. f. phys. Chem. **94**.
[3]) Ebendaselbst **100**.
[4]) Diese Zeitschr. **159**, 379, 1925.
[5]) Zeitschr. f. phys. Chem. **129**.
[6]) Diese Zeitschr. **168**, 48, 1926.
[7]) Zeitschr. f. phys. Chem. **141**.

1,56 Proz., bei *Soula* 1,54 Proz. Unsere Zahl für die Rinde des Hundes (1,67 Proz.) stimmt gut mit den Zahlen anderer Autoren (*Abderhalden* und *Weil* 1,70 Proz., *Waser* 1,86 Proz., *Palladin* und *Zuwerkalow*, auf Trockensubstanz berechnet, 8,15 Proz. (bei uns 8,39 Proz.) überein. Die Vermutung von *Tscherkes* und *Gorodissky*, daß durch entgegengesetzte Veränderungen in der chemischen Zusammensetzung der grauen und weißen Substanz bei Untersuchung des Gesamthirns eine Erhöhung des Gesamtstickstoffs hervortrete, ist als hinfällig zu verwerfen.

Unsere Versuche beweisen zur Genüge, daß die Veränderungen des Gehalts des Gesamtstickstoffs in der grauen und weißen Substanz einsinnig und parallel vorgehen. Ebenso widersprechend sind die Angaben über den Gesamtphosphor (Tabelle II). Wir fanden eine Erhöhung in der grauen Substanz auf 0,0342 Proz. (relative Zunahme 13,5 Proz.), in der weißen Substanz auf 0,0489 (relative Zunahme 11,3 Proz.), die erwähnten Autoren — eine Erniedrigung auf 0,0304 Proz. Unsere Angaben stimmen gut mit den Beobachtungen von *Hecker*, die am isolierten Zentralnervensystem des Frosches bei Urethannarkose eine Unterdrückung des Phosphorstoffwechsels von 0,03 auf 0,01 Proz. gefunden hatte, überein.

Zur Tabelle I zurückkehrend sehen wir, daß gleichzeitig mit Erhöhung des Gesamtstickstoffs eine Erhöhung des Reststickstoffs (für graue Substanz 0,1 Proz., relative Zunahme 47,6 Proz.; für weiße Substanz 0,18 Proz., relative Zunahme 100 Proz.) wie auch eine ganz geringe, hart an der Fehlergrenze der Methode liegende Erhöhung des Aminostickstoffs (für graue Substanz 0,008 Proz., relative Zunahme 1,43 Proz.; für weiße Substanz 0,008 Proz., relative Zunahme 1,8 Proz.) bestehe. Diese Befunde lassen die Vermutung aufkommen, daß unter Einwirkung des Chloroforms nicht der Prozeß des Eiweißabbaues verhindert ist, sondern daß die Abbauprodukte, infolge eventuell schlechter Blutzirkulation im Hirn, nicht entfernt werden. Wir betonen den provisorischen Charakter dieser Vermutung, die weiterer Versuche (die im Gange sind) bedarf.

Was die verschiedenen Lipoidgruppen anbelangt (Tabelle II), so ist eine Vermehrung aller Gruppen, sowohl in der grauen wie in der weißen Substanz, zu vermerken. Besonders scharf tritt dies in dem Auszug der ungesättigten Phosphatide (für graue Substanz 0,014 Proz., relative Zunahme 16,9 Proz.; für weiße Substanz 0,081 Proz., relative Zunahme 32,1 Proz.) zutage, was gut mit unseren Vorstellungen über die Stabilität der ungesättigten Verbindungen in Einklang steht. Geringe, aber deutliche Zunahme bekamen wir für Cholesterin (für graue Substanz 0,013 Proz., relative Zunahme 12,3 Proz., für weiße Substanz 0,63 Proz., relative Zunahme 13,4 Proz.). Als wenig gesichert betrachten wir die Zunahme für Lipoide des Alkolholauszugs (graue Substanz 0,32 Proz., relative Zunahme 13,4 Proz.; weiße Substanz

0,27 Proz., relative Zunahme 6,1 Proz.), da die Methode ihrer Bestimmung nicht als einwandfrei betrachtet werden kann. Die Zunahme der Cholesterine und ungesättigter Phosphatide ist in der weißen Substanz stärker als in der grauen. Dieser scheinbar paradoxale Befund — es hieß früher, daß Narkotica nur auf die Rinde einwirken — findet eine indirekte Bestätigung in den Versuchen von *Nicloux* und *Frison*[1]), daß nach langdauernder Narkose die weiße Substanz bedeutend mehr Chloroform enthält als die graue.

Schlußfolgerungen.

1. *Unter Einwirkung der Chloroformnarkose* ist bei Hunden eine *Zunahme des Gehalts der Lipoidgruppen zu verzeichnen.*

2. *Diese Zunahme betrifft sowohl die graue wie die weiße Substanz; für die Cholesterine und ungesättigten Phosphatide ist diese Zunahme in der weißen Substanz stärker* als in der grauen.

3. *Die Zunahme des Gesamtstickstoffs ist in der grauen und weißen Substanz ganz unbedeutend,* so daß man mit voller Sicherheit nur eine Abnahme auszuschließen berechtigt ist; *man könne höchstens von einer Tendenz zur Zunahme sprechen.*

---

[1]) C. r. Soc. biol. 62.

Über den Einfluß des Charakters der Nahrung auf die Prozesse der Synthese und Oxydation.

Von

Alexander Palladin und **D. Ferdmann.**

(Aus dem Ukrainischen Biochemischen Institut zu Charkow.)

(Eingegangen am 18. Januar 1927.)

Mit 4 Abbildungen im Text.

Der in Hinsicht auf das Vorherrschen von Kationen oder Anionen verschiedene Charakter der Nahrung setzt für den Ablauf dieser oder jener chemischen Prozesse im Tierorganismus verschiedene Bedingungen fest.

Die in dieser Richtung von *Abderhalden* und *Wertheimer* (1) angestellten Untersuchungen zeigten, daß die Wirkung von Adrenalin und Insulin vom Charakter der Fütterung des Tieres abhängt. Futter mit Überwiegen von Anionen — saures Futter — ergibt günstige Bedingungen für die Wirkungen von Adrenalin, und ungünstige für die Insulinwirkungen, Futter mit Überwiegen von Kationen (basisches Futter) hingegen wirkt in entgegengesetzter Weise. Bei saurem Futter nehmen, wie ihre Untersuchungen zeigen, die Alkalireserven des Blutes ab, während sie bei alkalischem Futter zunehmen. Bei der Untersuchung über den Einfluß des Charakters des Futters auf die synthetischen Prozesse im tierischen Organismus fanden *Abderhalden* und *Wertheimer* (2), daß Kaninchen zur Synthese von Mercaptursäure nur bei saurer Nahrung fähig sind, während bei basischem Futter diese Synthese überhaupt nicht stattfindet.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, den Einfluß von saurem und basischem Futter auf die Prozesse der Synthese und Oxydation zu untersuchen, die im tierischen Organismus ablaufen. Ausgehend von den vorläufigen Untersuchungen von *A. Palladin* und *O. Feinschmidt* (3), welche fanden, daß der Charakter des Futters auf die Fähigkeit des tierischen Organismus, Phenol zu oxydieren, einwirkt, beschlossen wir, zur Entscheidung dieser Frage das Phenol als Untersuchungsobjekt zu wählen. Aus den Berichten zahlreicher Autoren [*Baumann* und *Preusse* (4), *Jonge* (5), *Tauber* (6), *Harry Dubin* (7) u. a.] wissen wir, daß nach Einführung von Phenol in den tierischen Organismus ein Teil von ihm oxydiert und ein anderer auf die Bildung paariger

Verbindungen mit Schwefel- und Glycuronsäure verwendet wird, und ein dritter im Harn unverändert ausgeschieden wird, darum hielten wir auch das Phenol für unsere Untersuchungszwecke besonders geeignet; denn nach Injektion einer bestimmten Menge von Phenol bei dieser oder jener Nahrung und Bestimmung der hernach in gebundener und freier Form aus dem Organismus ausgeschiedenen Phenolmenge war es möglich, eine Vorstellung über die Fähigkeit des Organismus zur Oxydation und Synthese hinsichtlich des Phenols bei Futter von verschiedenem Charakter zu gewinnen.

Gegenwärtig gibt es zwei Methoden zur kolorimetrischen Bestimmung des Phenolgehalts im Harn. Die erste Methode wurde im Jahre 1915 von *Folin* und *Denis* (8) (9) vorgeschlagen und wird zur Bestimmung sowohl des freien, wie des gebundenen Phenols im Harn angewendet. Sie beruht darauf, daß das sogenannte Phenolreagens mit Phenol und seinen Derivaten eine Blaufärbung gibt, die für kolorimetrische Bestimmungen geeignet ist. Vor der Bestimmung des Phenols ist die Harnsäure aus dem Harn zu entfernen, da auch sie mit dem Phenolreagens Blaufärbung gibt. Die zweite Methode zur kolorimetrischen Phenolbestimmung im Harn wurde 1920 von *Weiss* (10) vorgeschlagen; sie bestimmt bloß den allgemeinen Phenolgehalt.

Da wir aber sowohl die Menge des freien wie des gebundenen Phenols getrennt zu bestimmen hatten und nicht bloß den Gesamtgehalt an Phenol, wendeten wir die Methode von *Folin* und *Denis* an. und zwar um so lieber, als sie bei ihrer Überprüfung ihre Genauigkeit und vollkommene Brauchbarkeit für die Beantwortung der von uns gestellten Fragen erwies.

Die Untersuchung wurde an Kaninchen vorgenommen. Als saures Futter diente Hafer, als basisches Rüben, Kartoffeln und Möhren. Das Phenol wurde als 2proz. Lösung injiziert, und zwar 100 mg pro 1 kg. Vor Beginn der Injektionen wurden die Tiere 10 bis 12 Tage bei saurem oder basischem Futter gehalten. Innerhalb dieser Zeit wurde die normale Phenolausscheidung und der Anteil des freien und gebundenen Phenols im Verhältnis zum Gesamtgehalt des Harns an Phenol bestimmt. Die Injektionen erfolgten in Zwischenräumen von 4 bis 8 Tagen, im Verlauf welcher sich die normale Phenolausscheidung wieder herstellte. Der Harn wurde alle 2 Tage gesammelt, und die Bestimmung des Phenols in diesen zweitägigen Portionen erfolgte nach der von *Goiffon* und *Nepveux* (11) modifizierten Methode von *Folin* und *Denis*.

Hierzu wurden 20 ccm verdünnten Harns mit 2 ccm 10proz. wolframsaurem Natron und 2 ccm $^2/_3$ n H_2SO_4 ausgefällt, das ausfallende Eiweiß wurde abfiltriert. Zu 12 ccm des Filtrats wurden 10 ccm 2,5proz. $ZnCl_2$-Lösung und 8 ccm 20proz. Na_2CO_3-Lösung hinzugefügt. Auf diese Weise wurde die Harnsäure entfernt. Zur Bestimmung des freien Phenols wurden 3 ccm des Filtrats (= 1 ccm Harn) genommen, in ein Meßkölbchen von

50 ccm Inhalt gegossen und 1 ccm Phenolreagens, 20 ccm 20proz. Na_2CO_3-Lösung und Wasser zu 50 ccm hinzugefügt. Zur Bestimmung des freien und gebundenen Phenols wurden 3 ccm des Filtrats zuerst mit 1 ccm konzentrierter HCl unter 10 Minuten langem Erwärmen am Wasserbad hydrolysiert, worauf die Flüssigkeit in einen Meßkolben von 50 ccm gebracht und auf die gewöhnliche Weise gefärbt wurde. Zum Vergleich wurden 2 ccm 0,00911 Proz. Resorcinlösung genommen. Eine derartige Resorcinlösung färbt sich so intensiv wie eine 0,01proz. Lösung von reinem Phenol. Die Standardlösung wird gleichfalls in einem Meßkolben von 50 ccm Inhalt durch Hinzufügen von 1 ccm Phenolreagens, 20 ccm Sodalösung und Wasserauffüllung bis zur Marke aufgefüllt.

Gehen wir nun zur Besprechung unserer Versuchsprotokolle über. Bei Kaninchen Nr. 1 wurde dreimal die Nahrung gewechselt. Zuerst bekam es saures Futter (Hafer), dann basisches (Rüben, Kartoffel, Möhren und etwas Heu) und hierauf wiederum saures (Hafer). Beim Übergang von einer Futterform auf die andere wurde eine Unterbrechung von 7 bis 10 Tagen gemacht, innerhalb welcher das Kaninchen gemischte Nahrung (Rüben und Hafer) erhielt.

Tabelle I.

Kaninchen Nr. 1. Saures Futter.

Datum	Gewicht des Kaninchens	Harnmenge von 2 Tagen	Menge des injizierten Phenols	Menge des gebundenen Phenols im Harn	Gesamtphenol im Harn	Gebundenes Phenol	Vom injizierten Phenol im Harn ausgeschieden		Gebundener Anteil des nach der Injektion ausgeschiedenen Phenols	
	g	ccm	g	g	g	Proz.	g	Proz.	g	Proz.
25. XII.	3500	190	—	0,041	0,125	32,8	—	—	—	—
27. XII.	3400	230	—	0,085	0,313	27,1	—	—	—	—
29. XII.	3420	120	—	0,045	0,167	27,0	—	—	—	—
31. XII.	3450	200	—	0,078	0,263	29,7	—	—	—	—
2. I.	3470	115	—	0,045	0,150	30,0	—	—	—	—
4. I.	3420	200	—	0,079	0,255	30,9	—	—	—	—
6. I.	3380	190	0,320	0,050	0,175	28,5	—	—	—	—
8. I.	3350	210	—	0,149	0,315	—	0,140	45,3	99	63,5
10. I.	3330	115	0,320	0,039	0,131	29,8	—	—	—	—
12. I.	3350	160	—	0,129	0,258	—	0,127	40,0	90	70,8
14. I.	3400	180	—	0,042	0,131	32,0	—	—	—	—
16. I.	3500	130	0,320	0,039	0,125	31,2	—	—	—	—
18. I.	3450	313	—	0,165	0,357	—	0,232	72,5	126	58,1
20. I.	3550	160	—	0,051	0,147	34,7	—	—	—	—
22. I.	3520	200	0,320	0,066	0,167	33,5	—	—	—	—
24. I.	3550	175	—	0,112	0,208		} 0,134	41,9	70	52,3
26. I.	3550	250	—	0,089	0,227					
28. I.	3550	220	—	0,065	0,189	34,5	—	—	—	—
30. I.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1. II.	3700	275	0,320	0,075	0,236	31,8	—	—	—	—
3. II.	3650	150	—	0,123	0,227	—	0,107	33,4	85	80,4
5. II.	3570	310	—	0,098	0,280	35,0	—	—	—	—
7. II.	3700	160	—	0,052	0,140	37,0	—	—	—	—

Aus dem Versuchsprotokoll (Tabelle I) ist zu ersehen, daß bei saurem Futter von dem normal im Körper sich bildenden Phenol 27 bis 37 Proz., d. h. im Mittel ungefähr 30 Proz., auf gebundenes Phenol entfallen.

Vom injizierten Phenol gelang es, im Harn 33,4 bis 72,5 Proz., d. h. im Mittel 46,6 Proz., wiederzufinden, wovon 52,3 bis 80,4 Proz. (im Mittel 66,1 Proz.) auf gebundenes Phenol entfallen.

Vom 7. bis 16. Februar erhielt das Kaninchen gemischtes Futter (Rüben und Hafer). Am 16. Februar wurde es auf basisches Futter übergeführt (Rüben, Kartoffel, Möhren und etwas Heu).

Aus der Tabelle II sehen wir, daß bei basischem Futter von der gesamten mit dem Harn unter normalen Verhältnissen (wenn Phenol

Tabelle II.

Kaninchen Nr. 1. Basisches Futter.

Datum	Gewicht des Kaninchens	Harnmenge von 2 Tagen	Menge des injizierten Phenols	Menge des gebundenen Phenols im Harn	Gesamtphenol im Harn	Gebundenes Phenol	Vom injizierten Phenol im Harn ausgeschieden		Gebundener Anteil des nach der Injektion ausgeschiedenen Phenols	
	g	ccm	g	g	g	Proz.	g	Proz.	g	Proz.
18. II.	3500	830	—	0,071	0,238	29,8	—	—	—	—
20. II.	3570	1050	—	0,052	0,223	23,3	—	—	—	—
22. II.	3400	1030	—	0,059	0,208	28,4	—	—	—	—
24. II.	3450	890	—	0,067	0,230	29,1	—	—	—	—
26. II.	3530	950	—	0,052	0,231	22,5	—	—	—	—
28. II.	3500	970	—	0,068	0,240	28,3	—	—	—	—
2. III.	3500	980	0,320	0,050	0,250	20,0	—	—	—	—
4. III.	3460	950	—	0,210	0,530	—	0,280	87,5	0,160	57,1
6. III.	3500	870	—	0,065	0,265	24,5	—	—	—	—
8. III.	3500	950	0,320	0,062	0,300	20,7	—	—	—	—
10. III.	3500	900	—	0,220	0,508	—	0,208	68,1	158	76,0
12. III.	3500	890	—	0,067	0,367	18,3	—	—	—	—
14. III.	3470	970	—	0,069	0,284	24,3	—	—	—	—
16. III.	3480	980	0,320	0,061	0,250	24,4	—	—	—	—
18. III.	3480	720	—	0,116	0,417		0,231	72,0	109	47,1
20. III.	3500	830	—	0,115	0,315					
22. III.	3500	870	—	0,052	0,283	18,4	—	—	—	—
24. III.	3500	1100	0,320	0,050	0,259	19,3	—	—	—	—
26. III.	3450	1050	—	0,195	0,480	—	0,221	69,0	0,145	65,6
28. III.	3420	950	—	0,060	0,260	23,4	—	—	—	—
30. III.	3400	900	0,320	0,046	0,225	24,0	—	—	—	—
1. IV.	3400	1030	—	0,188	0,402	—	0,177	55,3	0,142	80,2
3. IV.	3400	870	—	0,080	0,290	27,6	—	—	—	—
5. IV.	3400	570	0,320	0,058	0,235	24,7	—	—	—	—
7. IV.	3370	670	—	0,116	0,444	—	0,209	65,3	0,058	27,7
9. IV.	3400	870	—	0,106	0,390	27,1	—	—	—	—
11. IV.	3370	500	—	0,053	0,277	19,1	—	—	—	—

nicht injiziert wurde) ausgeschiedenen Phenolmenge 19,1 bis 29,8 Proz., d. h. im Mittel 23,7 Proz., als gebunden ausgeschieden wurden. Von injiziertem Phenol kamen mit dem Harn 55,3 bis 87,5 Proz., d. h. im Mittel 69,5 Proz., zur Ausscheidung, wovon 27,7 bis 80 Proz. (im Mittel 58,3 Proz.) auf gebundenes Phenol entfallen.

Vom 11. bis 17. April befand sich das Kaninchen auf gemischter Nahrung, am 17. April wurde es wiederum auf saures Futter übergeführt.

Aus der Tabelle III sehen wir, daß bei saurem Futter die Menge des gebundenen Phenols von der gesamten in der Norm ausgeschiedenen Phenolmenge sich wiederum auf 25,5 bis 40,3 Proz. erhebt und im Mittel 29,3 Proz. erreicht.

Tabelle III.

Kaninchen Nr. 1. Saures Futter.

Datum	Gewicht des Kaninchens	Harnmenge von 2 Tagen	Menge des injizierten Phenols	Menge des gebundenen Phenols im Harn	Gesamtphenol im Harn	Gebundenes Phenol	Vom injizierten Phenol im Harn ausgeschieden		Gebundener Anteil des nach der Injektion ausgeschiedenen Phenols	
	g	ccm	g	g	g	Proz.	g	Proz.	g	Proz.
19. IV.	3200	150	—	0,035	0,139	25,9	—	—	—	—
21. IV.	3200	300	—	0,041	0,161	25,5	—	—	—	—
23. IV.	3150	170	—	0,047	0,156	30,1	—	—	—	—
25. IV.	3120	180	—	0,049	0,156	31,4	—	—	—	—
27. IV.	3100	220	0,320	0,040	0,150	26,6	—	—	—	—
29. IV.	3050	300	—	0,100	0,240	—	0,090	28,1	0,060	66,6
1. V.	3020	260	—	0,045	0,145	31,0	—	—	—	—
3. V.	3020	180	0,320	0,037	0,135	27,5	—	—	—	—
5. V.	3000	250	—	0,126	0,257	—	0,122	38,1	0,089	67,4
7. V.	3000	220	—	0,036	0,132	27,3	—	—	—	—
9. V.	3000	200	0,320	0,048	0,152	31,5	—	—	—	—
11. V.	3000	240	—	0,119	0,238	—	0,086	26,9	0,071	82,6
13. V.	3000	210	0,320	0,063	0,156	40,3	—	—	—	—
15. V.	3000	240	—	0,110	0,217	—	0,061	19,0	0,047	77,0
17. V.	3000	220	—	0,048	0,152	31,5	—	—	—	—

Vom injizierten Phenol gelingt es, im Harn nur einen geringen Teil zu finden, und zwar von 19 bis 38,1 Proz. (im Mittel bloß 28 Proz.), wovon 66 bis 82,6 Proz. (im Mittel 73,4 Proz.) auf gebundenes entfallen.

Aus diesem Versuch mit dem Kaninchen Nr. 1 sehen wir, daß bei saurem Futter ein größerer Teil des Phenols in gebundener Form ausgeschieden wird (29 bis 30 Proz.) als bei basischem Futter, bei welchem 23,7 Proz. vom Gesamtphenolgehalt in gebundener Form ausgeschieden werden. Bei Phenolinjektion wird bei saurem Futter prozentual viel weniger injiziertes Phenol ausgeschieden (28 bis 46,6 Proz.) als bei

basischem (69,5 Proz.) (vgl. Abb. 1); mit anderen Worten, es ist anzunehmen, daß bei saurem Futter der Organismus die Möglichkeit besitzt, mehr Phenol zu oxydieren als bei basischem. Andererseits erweist sich bei saurer Fütterung vom nach der Injektion ausgeschiedenen Phenol prozentual eine größere Menge als gebundenes Phenol, als bei

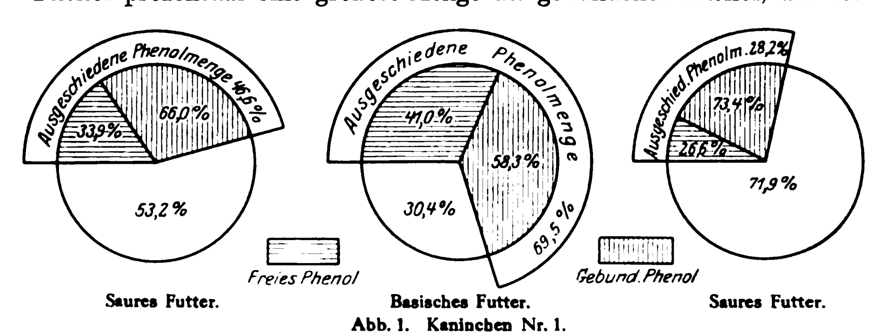


Abb. 1. Kaninchen Nr. 1.

basischer Fütterung. Mit anderen Worten, saures Futter begünstigt sowohl synthetische Prozesse (die Synthese paariger Phenolverbindungen) als auch Oxydationsprozesse (Oxydation des injizierten Phenols).

Beim Kaninchen Nr. 2 wurde ebenfalls dreimal das Futter gewechselt. Es bekam zuerst basisches, dann saures und dann wiederum basisches Futter.

Tabelle IV. Kaninchen Nr. 2. Basisches Futter.

Datum	Gewicht des Kaninchens	Harnmenge von 2 Tagen	Menge des injizierten Phenols	Menge des gebundenen Phenols im Harn	Gesamtphenol im Harn	Gebundenes Phenol	Vom injizierten Phenol im Harn ausgeschieden		Gebundener Anteil des nach der Injektion ausgeschiedenen Phenols	
	g	ccm	g	g	g	Proz.	g	Proz.	g	Proz.
31. XII.	2650	720	—	0,052	0,192	27,0	—	—	—	—
2. I.	2620	770	—	0,038	0,147	26,0	—	—	—	—
4. I.	2620	700	—	0,048	0,192	25,0	—	—	—	-
6. I.	2650	785	0,260	0,033	0,147	22,4	—	—	—	—
8. I.	2700	575	—	0,110	0,312	—	0,165	63,5	0,077	40,6
10. I.	2700	785	0,260	0,033	0,147	22,4	—	—	—	—
12. I.	2700	900	—	0,050	0,295	—	0,148	56,9	0,017	6,5
14. I.	2660	775	—	0,025	0,120	20,0	—	—	—	—
16. I.	2750	685	0,260	0,033	0,147	22,4	—	—	—	—
18. I.	2730	750	—	0,112	0,263	—	0,116	44,6	0,079	68,1
20. I.	2680	750	—	0,042	0,156	26,9	—	—	—	—
22. I.	2670	750	0,260	0,050	0,178	28,0	—	—	—	—
24. I.	2700	850	—	0,056	0,278	—	0,100	38,4	0,006	6,0
26. I.	2700	800	—	0,042	0,156	26,9	—	—	—	—
28. I.	2700	830	0,260	0,036	0,147	24,5	—	—	—	—
30. I.	2750	750	—	0,050	0,270	—	0,123	47,3	0,014	11,4
1. II.	2700	825	—	0,039	0,146	26,7	—	—	—	—
3. II.	2700	570	—	0,035	0,151	23,1	—	—	—	—

Aus der Tabelle IV sehen wir, daß bei saurem Futter von dem im Körper gebildeten und mit dem Harn zur Ausscheidung kommenden Phenol 20 bis 27 Proz., d. h. im Mittel 24 Proz., gebunden sind.

Vom injizierten Phenol wurden aus dem Organismus 38,4 bis 63,5 Proz., d. h. im Mittel 50,0 Proz., ausgeschieden, und von diesem waren im Mittel 26,5 Proz. gebunden.

Vom 11. bis 16. Februar erhielt das Kaninchen gemischtes Futter (Rüben und Hafer), worauf es auf saures übergeführt wurde (Hafer).

Tabelle V.

Kaninchen Nr. 2. Saures Futter.

Datum	Gewicht des Kaninchens	Harnmenge von 2 Tagen	Menge des injizierten Phenols	Menge des gebundenen Phenols im Harn	Gesamtphenol im Harn	Gebundenes Phenol	Vom injizierten Phenol im Harn ausgeschieden		Gebundener Anteil des nach der Injektion ausgeschiedenen Phenols	
	g	ccm	g	g	g	Proz.	g	Proz.	g	Proz.
18. II.	2750	70	—	0,055	0,141	39,0	—	—	—	—
20. II.	2700	50	—	0,045	0,113	39,5	—	—	—	—
22. II.	2700	45	—	0,037	0,107	34,6	—	—	—	—
24. II.	2730	65	—	0,050	0,138	36,2	—	—	—	—
26. II.	2750	45	—	0,042	0,114	36,8	—	—	—	—
28. II.	2730	50	—	0,042	0,110	38,2	—	—	—	—
2. III.	2750	65	0,260	0,047	0,147	32,0	—	—	—	—
4. III.	2750	75	—	0,125	0,250	—	0,103	40,0	0,078	75,7
6. III.	2800	35	—	0,020	0,061	32,2	—	—	—	—
8. III.	2800	110	0,260	0,072	0,200	36,0	—	—	—	—
10. III.	2800	70	—	0,155	0,295	—	0,095	36,5	0,083	87,4
12. III.	2800	55	—	0,056	0,156	35,9	—	—	—	—
14. III.	2800	100	—	0,038	0,120	31,7	—	—	—	—
16. III.	2800	40	0,260	0,042	0,138	30,4	—	—	—	—
18. III.	2800	55	—	0,067	0,143	—	—	—	—	—
20. III.	2800	110	—	0,052	0,119	—	—	—	—	—
22. III.	2750	55	—	0,047	0,147	32,0	—	—	—	—
24. III.	2750	70	0,260	0,047	0,147	32,0	—	—	—	—
26. III.	2750	65	—	0,122	0,250	—	0,103	40,0	0,075	72,8
28. III.	2750	60	—	0,041	0,119	34,4	—	—	—	—
30. III.	2770	90	0,260	0,042	0,119	35,3	—	—	—	—
1. IV.	2760	115	—	0,115	0,217	—	0,098	37,7	0,073	74,5
3. IV.	2780	65	—	0,064	0,164	39,0	—	—	—	—
5. IV.	2770	95	0,260	0,051	0,149	34,2	—	—	—	—
7. IV.	2800	70	—	0,120	0,256	—	0,107	41,1	0,069	62,4
9. IV.	2770	65	—	0,058	0,154	37,6	—	—	—	—
11. IV.	2800	55	—	0,046	0,132	37,3	—	—	—	—

Die Tabelle V zeigt, daß hier von dem im Organismus des Kaninchens gebildeten Phenol auf das gebundene 30,4 bis 39,5 Proz. (im Mittel 35,5 Proz.) entfallen.

Vom injizierten Phenol kamen mit dem Harn bloß 36,5 bis 41,1 Proz. (im Mittel 39 Proz.) zur Ausscheidung, wovon 62,4 bis 87,4 Proz. (im Mittel 74,5 Proz.) gebunden waren.

Vom 11. bis 17. April bekam das Kaninchen gemischtes Futter, worauf es wiederum auf basisches übergeführt wurde.

Aus der Tabelle VI ist zu ersehen, daß bei basischem Futter die Fähigkeit, das im Organismus gebildete Phenol zu binden, herabgesetzt ist und die Menge des gebundenen Phenols bloß 15,3 bis 28,1 Proz. (im Mittel 24,9 Proz.) beträgt.

Tabelle VI.

Kaninchen Nr. 2. Basisches Futter.

Datum	Gewicht des Kaninchens	Harnmenge von 2 Tagen	Menge des injizierten Phenols	Menge des gebundenen Phenols im Harn	Gesamtphenol im Harn	Gebundenes Phenol	Vom injizierten Phenol im Harn ausgeschieden		Gebundener Anteil des nach der Injektion ausgeschiedenen Phenols	
	g	ccm	g	g	g	Proz.	g	Proz.	g	Proz.
19. IV.	2800	500	—	0,023	0,150	15,3	—	—	—	—
21. IV.	2800	500	—	0,050	0,178	28,0	—	—	—	—
23. IV.	2800	650	—	0,061	0,222	27,4	—	—	—	—
25. IV.	2800	500	—	0,045	0,160	28,1	—	—	—	—
27. IV.	2850	520	0,260	0,043	0,160	27,0	—	—	—	—
29. IV.	2800	600	—	0,081	0,386	—	0,226	86,9	0,038	16,7
1. V.	2850	660	—	0,043	0,185	23,2	—	—	—	—
3. V.	2800	670	0,260	0,035	0,166	21,1	—	—	—	—
5. V.	2850	430	—	0,067	0,396	—	0,230	91,2	0,032	13,9
7. V.	2870	520	—	0,048	0,185	25,9	—	—	—	—
9. V.	2850	730	0,260	0,040	0,200	20,0	—	—	—	—
11. V.	2850	650	—	0,076	0,410	—	0,210	81,8	0,036	17,1
13. V.	2850	690	0,260	0,034	0,200	17,0	—	—	—	—
15. V.	2850	600	—	0,055	0,352	—	0,152	58,5	0,021	13,8

Im Harn gelingt es, vom injizierten Phenol 58 bis 91,2 Proz., im Mittel 79,6 Proz., zu finden, wovon bloß 13,8 bis 17,1 Proz., im Mittel 15,3 Proz. auf gebundenes entfallen (Abb. 2).

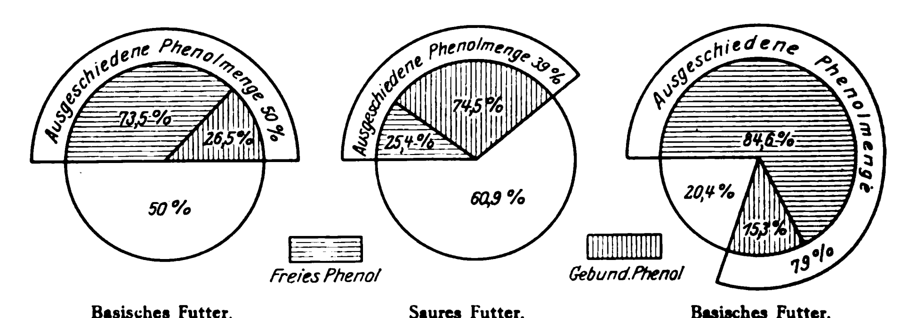


Abb. 2. Kaninchen Nr. 2.

Analoge Resultate wurden an anderen Kaninchen erhalten, denen saures oder basisches Futter verabreicht wurde. Beiliegend werden die Protokolle zweier solcher Versuche gebracht.

Tabelle VII.

Kaninchen Nr. 4. Basisches Futter.

Datum	Gewicht des Kaninchens	Harnmenge von 2 Tagen	Menge des injizierten Phenols	Menge des gebundenen Phenols im Harn	Gesamt-Phenol im Harn	Gebundenes Phenol	Vom injizierten Phenol im Harn ausgeschieden		Gebundener Anteil des nach der Injektion ausgeschiedenen Phenols	
	g	ccm	g	g	g	Proz.	g	Proz.	g	Proz.
21. IV.	2850	750	—	0,032	0,217	14,8	—	—	—	—
23. IV.	2850	700	—	0,041	0,227	18,9	—	—	—	—
25. IV.	2830	870	—	0,038	0,210	18,1	—	—	—	—
27. IV.	2850	760	0,280	0,034	0,227	18,1	—	—	—	—
29. IV.	2850	800	—	0,070	0,500	—	0,273	97,5	0,036	13,2
1. V.	2870	820	—	0,038	0,205	18,5	—	—	—	—
3. V.	2870	820	0,280	0,022	0,200	11,0	—	—	—	—
5. V.	2850	720	—	0,085	0,400	—	0,200	68,5	0,063	31,5
7. V.	2870	720	—	0,043	0,195	22,0	—	—	—	—
9. V.	2850	700	0,280	0,050	0,220	22,7	—	—	—	—
11. V.	2870	600	—	0,092	0,430	—	0,210	75,0	0,042	20,0
13. V.	2870	650	0,280	0,040	0,200	20,0	—	—	—	—
15. V.	2870	550	—	0,070	0,400	—	0,200	68,5	0,030	15,0
17. V.	2860	700	—	0,048	0,210	22,7	—	—	—	—

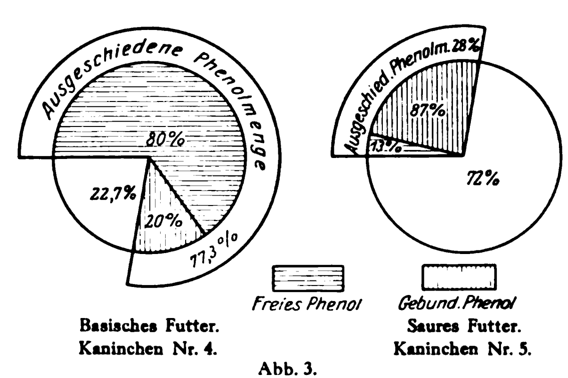
Aus der Tabelle VII ist zu ersehen, daß beim Kaninchen Nr. 4 von dem bei basischem Futter im Organismus gebildeten Phenol auf gebundenes 11 bis 27,7 Proz. (im Mittel nur 18 Proz.) entfallen. Vom injizierten Phenol wurde ein großer Teil, 68,5 bis 97,5 Proz. (im Mittel 77,3 Proz.), mit dem Harn ausgeschieden. Gebundenes Phenol findet sich in ihm aber nur wenig, 13,2 bis 31,5 Proz., im Mittel 19,9 Proz.

Tabelle VIII.

Kaninchen Nr. 5. Saures Futter.

Datum	Gewicht des Kaninchens	Harnmenge von 2 Tagen	Menge des injizierten Phenols	Menge des gebundenen Phenols im Harn	Gesamt-Phenol im Harn	Gebundenes Phenol	Vom injizierten Phenol im Harn ausgeschieden		Gebundener Anteil des nach der Injektion ausgeschiedenen Phenols	
	g	ccm	g	g	g	Proz.	g	Proz.	g	Proz.
29. IV.	2500	160	—	0,044	0,109	40,4	—	—	—	—
1. V.	2500	120	—	0,028	0,093	30,0	—	—	—	—
3. V.	2500	140	0,260	0,028	0,100	28,0	—	—	—	—
5. V.	2500	130	—	0,086	0,166	—	0,066	25,4	0,058	87,8
7. V.	2470	170	—	0,032	0,100	32,0	—	—	—	—
9. V.	2450	130	0,260	0,028	0,095	29,5	—	—	—	—
11. V.	2450	150	—	0,098	0,166	—	0,071	27,4	0,070	98,6
13. V.	2400	135	0,260	0,030	0,085	35,2	—	—	—	—
15. V.	2400	150	—	0,090	0,166	—	0,081	31,1	0,060	74,0
17. V.	2400	140	—	0,028	0,085	32,9	—	—	—	—

Die Tabelle VIII zeigt, daß beim Kaninchen Nr. 5 bei saurer Nahrung vom im Körper gebildeten Phenol auf gebundenes 28 bis 40 Proz. (im Mittel 31,6 Proz.) entfallen. Vom injizierten Phenol gelang es, im Harn 25,4 bis 31 Proz. (im Mittel 27,6 Proz.) zu finden, wovon 86,6 Proz. gebunden waren (Abb. 3).

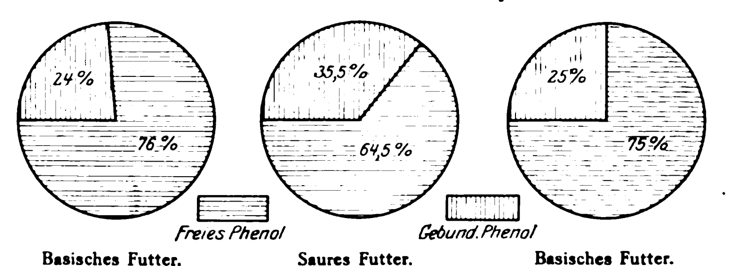


Basisches Futter. Kaninchen Nr. 4. Saures Futter. Kaninchen Nr. 5.

Abb. 3.

Alle diese Resultate zeigen, daß *bei saurem Futter die Bedingungen zur Oxydation des Phenols im Organismus des Kaninchens günstiger sind als bei basischem Futter.* Bei saurem gelingt es, vom injizierten Phenol im Harn 46,6 bis 28 Proz. zu finden. Bei basischem Futter ändern sich diese Bedingungen. Hier sind die Bedingungen für die Oxydation des Phenols weniger günstig, und vom injizierten Phenol gelingt es, im Harn 50 bis 79,6 Proz. aufzufinden. Was den Einfluß des Futters auf die Prozesse von Synthese gepaarter Phenolverbindungen anbelangt, so sprechen auch hier die Resultate dafür, daß *bei saurem Futter die Bedingungen zum Zustandekommen von synthetischen Prozessen günstiger sind als bei basischem.* Bei ersterem schwankt die Menge des ausgeschiedenen injizierten Phenols im Mittel zwischen 66,1 bis 86,6 Proz., während bei letzterem seine Menge herabgesetzt ist und im Mittel 15,4 bis 58,3 Proz. beträgt.

Diese bei basischem Futter verringerte Fähigkeit des Organismus, paarige Phenolverbindungen zu synthetisieren, ist deutlich an den Tagen zu erkennen, an welchen Phenol nicht injiziert wird und wir die



Basisches Futter. Saures Futter. Basisches Futter.

Abb. 4. Kaninchen Nr. 2. Spontane Phenolausscheidung.

Menge des im Organismus gebildeten und mit dem Harn ausgeschiedenen Phenols bei dieser oder jener Nahrung bestimmen. Wir sehen, daß in diesem „spontan" ausgeschiedenen Phenol bei basischem Futter auf das gebundene Phenol ein geringerer Prozentsatz entfällt (18 bis 24 Proz.) als bei saurem Futter (29,3 bis 35 Proz.) (vgl. Abb. 4).

Auf diese Weise zeigt es sich, daß *saures Futter im Organismus bessere Bedingungen schafft, sowohl für die Prozesse der Bindungen von Phenol, d. h. der Synthese gepaarter Verbindungen* (und möglicherweise auch für andere synthetische Verbindungen im Organismus), *wie auch für die Oxydationsprozesse des in den Körper eingeführten Phenols.*

Zusammenfassung.

1. Bei der Bestimmung des im Harn von Kaninchen bei saurem und basischem Futter enthaltenen Phenols zeigte es sich, daß bei saurem Futter eine prozentual bedeutend größere Menge gebundenen Phenols ausgeschieden wird als bei basischem Futter.

2. Bei der Injektion von Phenol bei „sauren" und „basischen" Kaninchen in gleicher Dosis gelingt es, im Harn Phenol in nicht gleicher Dosis wiederzufinden; bei saurem Futter kommt stets ein geringerer Prozentsatz des injizierten Phenols zur Ausscheidung als bei basischem; mit anderen Worten, bei saurer Nahrung oxydiert ein größerer Teil von Phenol als bei basischer.

3. Bei „sauren" und „basischen" Kaninchen bestehen in dem nach der Injektion ausgeschiedenen Phenol zwischen dem freien und gebundenen Phenol nicht die gleichen Verhältnisse. Bei sauren Kaninchen findet sich gebundenes Phenol stets in größerer Menge als bei basischen.

4. Die Untersuchungen zeigen demnach, daß saures Futter im Organismus günstigere Bedingungen sowohl für die Prozesse der Synthese (Synthese paariger Phenolverbindungen), wie auch für die Prozesse der Oxydation des injizierten Phenols schafft.

Literatur.

1) *Abderhalden* und *Wertheimer*, Pflügers Arch. **203**, 439, 1924. — 2) *Dieselben*, ebendaselbst **207**, 213, 1925. — 3) *A. Palladin* und *O. Feinschmidt*, Journ. f. exper. Biol. u. Med. 1925, Nr. 1 (russisch). — 4) *Baumann* und *Preusse*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **3**, 156, 1879. — 5) *Jonge*, ebendaselbst **3**, 177, 1879. — 6) *Tauber*, ebendaselbst **2**, 366, 1878. — 7) *Harry Dubin*, Journ. of biol. Chem. **26**, 69, 1916. — 8) *Folin* and *Denis*, ebendaselbst **22**, 305, 1915. — 9) *Dieselben*, ebendaselbst **11**, 323, 1912. — 10) *Weiss*, diese Zeitschr. **110**, 258, 1920. — 11) *Goiffon* et *Nepveux*, Ber. über d. ges. Physiol. u. exper. Pharm. **24**, 1925.

Über physiologische Acidität von Ammoniumnitrat.

Von

D. Prianischnikow.

(Aus der landwirtschaftlichen Akademie Petrowsko-Rasumowskoje, Moskau.)

(Eingegangen am 18. Januar 1927.)

Bei unseren früheren Versuchen haben wir mehrfach beobachtet, daß das Ammoniak von den Pflanzen viel schneller aufgenommen wird als Salpetersäure; auch die Bildung von organischen Stickstoffsubstanzen auf Kosten von Ammoniak geht viel energischer vor sich, wenn man nur die negativen Nebeneinflüsse ausschließt, wie z. B. die schädliche Wirkung von starken Säuren, welche das Ammoniak in solchen Salzen, wie NH_4Cl oder $(NH_4)_2SO_4$, begleiten.

Eine sehr bequeme Form, um die Aufnahme von NH_3 und HNO_3 zu vergleichen, ist Ammoniumnitrat. Die erste Bekanntschaft mit den physiologischen Eigenschaften dieses Salzes haben wir noch bei unseren Phosphatstudien in den Jahren 1900 bis 1901 gemacht, indem wir konstatiert haben, daß unter dem Einfluß von NH_4NO_3 die schwerlöslichsten Phosphate für alle Pflanzen zugänglich werden; diese Tatsachen wurden im nächstfolgenden Jahre durch die Kultur in sterilem Medium und durch die Methode der isolierten Ernährung bestätigt[1]).

Es erwies sich also, daß NH_4NO_3 als physiologisch saures Salz zu betrachten ist.

Im Anfang haben wir die Frage gestellt, ob es nicht richtiger wäre, in diesem Falle von einer physiologischen Amphoterität zu sprechen, da in unseren Versuchen, wie auch in denen von *Mazé* und *Kossowitsch*, die Anwesenheit von basischen Substanzen im Nährmedium[2]) eine beschleunigende Wirkung auf die Aufnahme von Ammoniak ausüben konnte; aber es erwies sich später, in den Versuchen von *Schulow*, welche in unserem Laboratorium ausgeführt wurden, daß die Maispflanzen auch in Anwesenheit von KH_2PO_4 aus NH_4NO_3 mehr NH_3

---

[1]) Vgl. die Mitteilungen des Verfassers in den Landw. Versuchsst. **56**, 132; **65**, 45.

[2]) Wie $Ca_3(PO_4)_2$, $CaCO_3$ und $Fe(OH)_3$. Vgl. Ann. de l'Inst. Pasteur **14**; Journ. f. exper. Landw. **5**, 1904.

als HNO_3 aufnehmen[1]). Bald darauf haben wir bei etiolierten Keimlingen einen viel schnelleren Gang von Asparaginsynthese beobachtet, wenn den Pflanzen (Zea Mays und Vicia sativa) NH_4Cl und $CaCO_3$ dargeboten wurde, als wenn $Ca(NO_3)_2$ als Stickstoffquelle diente[2]).

Später (1923) sind wir wieder zum Studium der physiologischen Eigenschaften von NH_4NO_3 zurückgekehrt, da die Fortschritte in der Methodik jetzt besser als früher gestatteten, die Veränderungen der Reaktion und der Zusammensetzung der Lösungen in kleineren Zeitintervallen zu verfolgen.

Dabei konnten wir uns überzeugen, daß die physiologische Acidität von NH_4NO_3 noch stärker ausgeprägt ist, als wir früher dachten. Die etiolierten Keimlinge, auf 0,001 n Lösung von NH_4NO_3 gezogen, nehmen NH_3 so begierig auf, daß man nach wenigen Tagen statt der Anfangsgröße $p_H = 7,0$ die Größen 3,7 bis 3,9 bekommt; bei kurzfristigen Versuchen unterscheidet sich in dieser Hinsicht NH_4NO_3 kaum von NH_4Cl. Die bei vollem Licht gezogenen stärkeren Pflanzen (20 bis 30 Tage alt), in eine Lösung von NH_4NO_3 gebracht, können schon nach 2 bis 3 Stunden das p_H der Lösung merklich herabdrücken. In diesem Falle verhalten sich die Leguminosen ebenso wie die Gramineen, wie z. B. aus folgenden, von *Domontowitsch* und *Dratschew* erhaltenen Resultaten zu ersehen ist[3]).

Alter der Pflanzen	Dauer des Versuchs	p_H		Aufgenommen (in Proz. von gegebener Menge)	
		vor dem Versuch	nach dem Versuch		
Tage	Stunden			NH_3	HNO_3
		Versuche mit Erbsen.			
20	2	5,4	4,8	7,7	0*)
20	4	5,4	4,8	33,7	0
30	3	6,4	5,5	61,5	19,3
		Versuche mit Hafer.			
22	2	5,8	4,8	27,9	5,0
14	2	6,4	6,2	18,3	0 usw.

*) Die Konzentration von NH_4NO_3-Lösung war verschieden (0,0002 bis 0,001 n).

[1]) Wenigstens in jüngeren Entwicklungsstadien; in späteren Stadien bleibt selbstverständlich den Pflanzen nichts anderes übrig, als mehr Salpetersäure aufzunehmen, wenn die Menge von eingeführtem NH_4NO_3 nicht übermäßig groß ist. Vgl. *Schulow*, Sterile Kulturen der höheren Pflanzen und Methode der isolierten Ernährung, 1912 (russisch); vorläufige Mitteilung in den Berichten der Deutsch. Bot. Gesellschaft Bd. 13.

[2]) Ergebnisse der Vegetationsversuche 9, 1914 (russisch); Landw. Versuchsst. **99**, 267; Ergebn. d. Biol. **1**, 411.

[3]) Vgl. *Prianischnikow* and *Domontowitsch*, Problem of a proper nutrient medium (Soil Science **21**, 341).

In Summa können wir aus allen bei uns ausgeführten Versuchen schließen, daß in der Regel das Ammoniak viel schneller aufgenommen und zur Synthese ausgenutzt wird als Salpetersäure.

Nun gibt es aber Fälle, in welchen eine Abweichung von dieser Regel vorzuliegen scheint.

Solche Fälle waren auch bei uns vorhanden; in der Literatur können wir auf die Arbeit von *Pantanelli*[1]) hinweisen, welcher bei den älteren Keimlingen von Vicia faba und Cicer arietinum eine größere Aufnahme von HNO_3 gegen NH_3 beobachtete.

Auf Grund unserer früheren Versuche mit NH_4Cl und $(NH_4)_2SO_4$ dachten wir schließen zu können, daß auch im Falle von NH_4NO_3 das Endresultat von solchen Umständen abhängen muß, wie Ernährungszustand der Pflanzen und Reaktion des Mediums, eventuell auch die Konzentration der Ammoniaksalzlösung.

Zuerst haben wir die Versuche über den Einfluß von NH_4NO_3 in verschiedenen Konzentrationen auf die Pflanzen mit verschiedenem Kohlehydratvorrat angestellt; dazu wurden zum Teil grüne Pflanzen genommen, zum Teil etiolierte Keimlinge von verschiedenem Alter, also mit abnehmendem Kohlehydratvorrat.

Solche Versuche mit Erbsen und Hafer wurden auf unsere Veranlassung von *Fr. Skossyrewa* im Jahre 1926 ausgeführt. Die Pflanzen wurden zuerst in Leitungswasser kultiviert, dann einen Tag vor dem Versuch in destilliertes Wasser übertragen. Unmittelbar vor dem Versuch wurden die Wurzeln mit destilliertem Wasser abgespült und dann jede Gruppe der Pflanzen in etwa 200 ccm NH_4NO_3-Lösung von bestimmter Konzentration eingesetzt.

In Serie I der Versuche mit grünen Erbsenpflanzen von dreiwöchigem Alter wurden folgende Resultate gewonnen.

1. Versuch.

(Dauer 2 Stunden; Zahl der Pflanzen 30.)

Konzentration der NH_4NO_3-Lösung:		0,1	0,01	0,001 n
Stickstoff aufgenommen	als NH_3	51,0	8,2	1,1 mg
	als HNO_3	22,0	6,0	0,74 „
Dasselbe in Proz. von gegebenen Mengen	NH_3	18,7	30,1	40,0 Proz.
	HNO_3	8,0	22,0	27,2 „

[1]) Über Ionenaufnahme. Jahrb. f. wissensch. Bot. 1915.



2. Versuch.

(Mit denselben Pflanzen; Dauer 4 Stunden.)

Konzentration der NH_4NO_3-Lösung:		0,1	0,01	0,001	0,0001 n
Stickstoff aufgenommen	als NH_3	46,6	6,9	1,7	0,25 mg
	als HNO_3	8,0	2,2	0,8	0,25 „
Dasselbe in Proz. von gegebenen Mengen	NH_3	18,6	27,8	67,6	100 Proz.
	HNO_3	3,2	8,8	32,0	100 „

3. Versuch.

(Mit denselben Pflanzen; Dauer 6 Stunden.)

Konzentration der NH_4NO_3-Lösung:		0,1	0,01	0,001	0,0001 n
Stickstoff aufgenommen	als NH_3	92,7	7,5	1,4	0,226 mg
	als HNO_3	4,0	2,0	1,24	0,226 „
Dasselbe in Proz. von gegebenen Mengen	NH_3	41,0	33,2	60,6	100 Proz.
	HNO_3	1,7	8,8	54,8	100 „

Es haben also die assimilierenden Erbsen bei den Konzentrationen 0,001 n bis 0,1 n regelmäßig mehr NH_3 als HNO_3 aufgenommen; bei schwächerer Konzentration (0,0001 n) wurde während des Versuchs die gesamte Menge des gegebenen Stickstoffs verbraucht, darum konnte keine Differenz zwischen den Mengen des aufgenommenen NH_3 und HNO_3 beobachtet werden.

Serie II. Junge etiolierte Erbsenkeimlinge. Diesmal wurden die Versuche mit etiolierten Erbsenkeimlingen ausgeführt, aber mit solchen, welche noch nicht viel Stärke verbraucht haben; darum wurden die Pflanzen nur 5 Tage auf Leitungswasser in der Dunkelheit gezogen, dann ebenso, wie oben beschrieben, zum Versuch gebraucht.

1. Versuch.

(Dauer 2 Stunden; 50 Pflanzen.)

Konzentration:		0,2	0,1	0,01	0,001 n
Stickstoff aufgenommen	NH_3	16,0	55,2	9,8	1,18 mg
	HNO_3	8,0	21,9	3,9	0,57 „
In Proz.	NH_3	3,0	20,7	36,8	44,3 Proz.
	HNO_3	1,5	8,2	14,9	21,3 „

2. Versuch.

(Dauer 6 Stunden; dieselben Pflanzen.)

Konzentration:		0,2	0,1	0,01	0,001 n
Stickstoff aufgenommen	NH_3	24,0	78,7	14,1	1,49 mg
	HNO_3	16,0	43,0	5,0	0,83 „
In Proz.	NH_3	4,5	29,6	53,0	56,0 Proz.
	HNO_3	3,0	16,1	18,7	33,4 „

3. Versuch.

(Dauer 4 Stunden; frische Pflanzen.)

Konzentration:	0,1	0,01	0,001 n
Stickstoff aufgenommen NH_3 . . .	60,6	14,0	1,37 mg
Stickstoff aufgenommen HNO_3 . .	24,0	4,3	0,82 „
In Proz. NH_3	22,4	52,1	51,6 Proz.
In Proz. HNO_3	9,0	16,0	30,8 „

4. Versuch.

(Dauer 8 Stunden; dieselben Pflanzen wie im dritten Versuch.)

Konzentration:	0,2	0,1	0,01	0,001	0,0001 n
Stickstoff aufgenommen NH_3 . . .	44,0	81,8	15,4	1,70	0,266 mg
Stickstoff aufgenommen HNO_3 . .	14,4	54,4	5,5	0,98	0,266 „
In Proz. NH_3	8,4	30,7	37,9	63,8	100 Proz.
In Proz. HNO_3	2,7	20,4	20,5	36,8	100 „

Die Resultate für etiolierte Keimlinge, wenn sie noch jung sind, stimmen vollständig mit denen, welche wir für assimilierende Pflanzen bekommen haben, überein; die Aufnahme von Ammoniak bei Konzentrationen (0,2 bis 0,001 n) nimmt immer überhand, bei großer Verdünnung (0,0001 n) können beide Komponenten von NH_4NO_3 ohne Rest verbraucht werden.

Serie III. Ältere etiolierte Erbsenkeimlinge. Diesmal wurden die Erbsen im Dunkeln 15 Tage auf Leitungswasser gezogen und nur dann zum Versuch gebraucht.

1. Versuch.

(Dauer 2 Stunden; 50 Keimlinge.)

Konzentration:	0,2	0,1	0,01	0,001 n
Stickstoff aufgenommen NH_3 . . .	6,8	29,6	5,98	0,61 mg
Stickstoff aufgenommen HNO_3 . .	18,1	56,9	14,19	1,23 „
In Proz. NH_3	1,2	10,5	22,0	22,5 Proz.
In Proz. HNO_3	3,3	20,9	52,3	45,4 „

2. Versuch.

(Dauer 6 Stunden; dieselben Pflanzen.)

Konzentration:	0,2	0,1	0,01	0,001 n
Stickstoff aufgenommen NH_3 . . .	28,8	32,0	4,5	0,81 mg
Stickstoff aufgenommen HNO_3 . .	36,2	36,2	12,1	1,65 „
In Proz. NH_3	5,3	11,7	16,5	29,9 Proz.
In Proz. HNO_3	6,7	13,3	44,4	60,7 „

3. Versuch.

(Dauer 4 Stunden; 50 frische Keimlinge.)

	Konzentration:	0,2	0,1	0,01	0,001 n
Stickstoff aufgenommen	NH_3 . . .	10,4	48,2	3,7	0,62 mg
	HNO_3 . .	—	82,2	15,9	1,19 „
In Proz.	NH_3.	1,9	17,7	13,7	22,8 Proz.
	HNO_3	—	30,3	58,5	43,9 „

4. Versuch.

(Dauer 8 Stunden; dieselben Pflanzen wie im dritten Versuch.)

	Konzentration:	0,2	0,1	0,01	0,001 n
Stickstoff aufgenommen	NH_3 . . .	14,4	34,0	5,4	0,94 mg
	HNO_3 . .	45,2	87,2	18,8	1,81 „
In Proz.	NH_3	3,4	12,5	19,8	34,6 Proz.
	HNO_3	8,3	32,1	69,4	66,6 „

Hier sehen wir ein ganz anderes Bild: in allen Versuchen der Serie III, welche mit älteren Keimlingen ausgeführt wurden, haben die Pflanzen mehr Salpetersäure aufgenommen als Ammoniak, oder wenigstens sieht so das Endresultat der komplizierteren Vorgänge aus, in deren Betrachtung wir unten näher eingehen werden.

Die Serie IV der Versuche mit Erbsen, welche mit noch älteren (21 Tage) etiolierten Keimlingen durchgeführt wurde, hat in allen Fällen dieselben Resultate gegeben wie die Versuche der Serie III, darum wollen wir die Ziffernangaben für die Serie IV hier nicht anführen[1]).

Ebenso werden wir hier nicht die Resultate von drei Serien der Versuche angeben, welche wir mit Hafer durchgeführt haben; es sei nur notiert, daß der Hafer, wie für eine kohlehydratreiche Frucht zu erwarten war, in der Dunkelheit das normale Verhalten gegen NH_3 und HNO_3 länger bewahrt als Erbsen, und der Umkehrungspunkt fällt beim Hafer auf eine spätere Periode. Wir müssen also schließen, daß es der Ernährungszustand der Pflanze ist, welcher hier die hauptsächlichste Rolle spielt; den Konzentrationsdifferenzen gehört nur eine sekundäre Rolle.

Im ganzen sehen wir ein uns sehr gut bekanntes Bild: Das Verhalten der kohlehydratarmen Pflanzen gegen NH_4NO_3 ist dasselbe wie gegen NH_4Cl und $(NH_4)_2SO_4$.

[1]) Es sei nur erwähnt, daß bei sehr schwachen Konzentrationen (0,0001 n) auch die älteren Keimlinge sich nicht anders verhielten als die jüngeren; die Erklärung wird unten gegeben.

Wir haben nämlich bei unseren Versuchen [1908 bis 1915[1])] über das Verhalten der etiolierten Keimlinge gegen Ammoniaksalze drei verschiedene Typen von Pflanzen unterscheiden können.

1. Die Keimlinge von solchen Samen, welche nicht viel Eiweiß und sehr viel Stärke enthalten, wie z. B. Cerealien, verarbeiten das Ammoniak ganz leicht, wenn es in Form von physiologisch sauren Salzen (wie NH_4Cl usw.) dargeboten wird, unter Bildung der entsprechenden Mengen von Asparagin.

2. Die Keimlinge von solchen Leguminosen, welche stärkehaltige Samen haben, aber doch weniger Stärke und mehr Eiweiß als die Gramineen enthalten, können die Asparaginsynthese auf Kosten von physiologisch sauren Ammoniumsalzen nur in dem Falle durchführen, wenn die physiologische Acidität der Lösung durch Zusatz von $CaCO_3$ beseitigt wird; hierher gehören Pisum- und Vicia-Arten.

3. Zu dem dritten Typus gehören die Lupinen, welche sehr eiweißreich sind (35 Proz. Eiweiß und mehr), keine Stärke führen und sonst nicht viel Kohlehydrate (Hemicellulosen) enthalten. Die Ernährung der Lupinenkeimlinge (wenigstens von L. luteus) mit NH_4Cl führt überhaupt nicht zur Asparaginsynthese, und noch mehr — es leidet dabei überhaupt die synthetische Funktion —, auch „eigenes Ammoniak“ wird als solches angehäuft, ohne Asparagin zu bilden; man beobachtet sogenannte „Ammoniakvergiftung“ der Pflanzen, der Zellsaft wird alkalisch und die Keimlinge enthalten endlich viel mehr Ammoniak, als sie von außen aufgenommen haben. Die Grundursache dieser Unterschiede zwischen einzelnen Pflanzen liegt in den verschiedenen Mengen von Kohlehydraten, welche einem Gewichtsteil der Eiweißstoffe entsprechen, es kommen nämlich bei Weizen 5 bis 6 Teile, bei Erbsen 2 bis 2,5 Teile und bei gelben Lupinen nur 0,6 Teile Kohlehydrate (dabei wenig lösliche) auf 1 Teil Eiweißstoffe. Wenn man aber bei Weizen und Gerste den Kohlehydratvorrat durch Aushungern der Keimlinge stark verringert, dann bekommt man einen Übergang zum Lupinentypus und umgekehrt: durch künstliche Kohlehydratzufuhr lassen sich die Lupinenkeimlinge in die erste Gruppe überführen.

Wenn wir jetzt zu den oben beschriebenen Versuchen mit Ammoniumnitrat zurückkehren und daran erinnern, daß nach unseren Ver-

[1]) Vgl. *Prianischnikow*, Ammoniak als Alpha und Omega des Stickstoffumsatzes in der Pflanze, 1916 (russisch mit französischem Resumé). Zusammenfassende Artikel in deutscher Sprache: Landw. Versuchsst. 1922. Siehe auch die Abhandlung des Verfassers „Asparagin und Harnstoff“, diese Zeitschr. 150, 407, 1924.



suchen aus dem Jahre 1923 dieses Salz nach seiner physiologischen Acidität bei kurzdauernden Versuchen sich von Ammoniumchlorid kaum unterscheidet, dann müssen wir sagen, daß die gewonnenen Resultate ganz denen entsprechen, welche a priori zu erwarten sind.

Die Erbsenkeimlinge, die längere Zeit im Dunkeln wuchsen, den Kohlehydratvorrat stark erschöpft haben und in physiologischem Sinne „lupinenähnlich" geworden sind, mußten unter dem Einfluß des Ammoniumnitrats durch die Störung in den synthetischen Funktionen leiden und das Ammoniak in ihren Geweben anhäufen, sie konnten das Ammoniak in das äußere Medium ausscheiden und in dieser Weise eine kleinere Aufnahmefähigkeit von NH_3 gegen HNO_3 vortäuschen.

Man könnte noch die Frage stellen, ob nicht in unseren Versuchen mit älteren Keimlingen eine Ammoniakausscheidung wegen Hungerzustandes als solche stattgefunden hat; es hat nämlich *Butkewitsch*[1]) gezeigt, daß die Lupinen- und Erbsenkeimlinge nach Erschöpfung des Kohlehydratvorrats an Ammoniakvergiftung leiden (dieselbe Erscheinung kann bei sonst normalen Keimlingen durch anästhesierende Mittel hervorgerufen werden). Wenn das der Fall wäre, dann müßte diese Erscheinung bei allen Konzentrationen von NH_4NO_3 auftreten, und auch bei größter Verdünnung (0,0001 n) müßten wir eine stärkere Aufnahme von HNO_3 gegen NH_3 beobachten; gerade aber in diesem Falle liegt diese Abnormität nicht vor.

Man muß also den Einfluß von physiologisch saurem Salz voraussetzen, welcher nur bei nicht zu kleinen Konzentrationen zum Vorschein kommt.

Und an noch einen Umstand müssen wir erinnern: Wenn den Pflanzen kein physiologisch saures Salz geboten ist, kann der Fall vorliegen, daß die Pflanzen Ammoniak ausscheiden, ohne sich direkt im Hungerzustande zu befinden; dies kann durch zu reichlichen Zufluß von Stickstoffnahrung hervorgerufen werden, wenn das in Nitratform geschieht.

So hat *Warburg*[2]) gezeigt, daß Chlorellazellen im Dunkeln Ammoniak auf Kosten von $NaNO_3 + HNO_3$ bilden; im Anfang des Versuchs sind die Ammoniakmengen nicht groß, aber sie nehmen mit der Dauer des Versuchs zu. Stickstoffhungrige Algen zeigen keine Ammoniakbildung, aber mit Stickstoff im Überschuß gesättigte Zellen scheiden reichlich Ammoniak in das äußere Medium aus. *Warburg* unterscheidet die

[1]) Diese Zeitschr. **12**, 314, 1908 (außerdem frühere Mitteilungen in russischer Sprache seit 1904).
[2]) Diese Zeitschr. **110**, 66, 1920.

Perioden der Assimilation und der reinen Reduktion; im zweiten Falle (bei relativem Kohlehydratmangel) wird HNO_3 zu NH_3 reduziert, aber es geht keine Neubildung von organischer, stickstoffhaltiger Substanz vor sich. Außer Beobachtungen von *Warburg* über Chlorella und von *Kostytschew*[1]) über Schimmelpilze gibt es eine große Reihe von ebensolchen Beobachtungen über höhere Pflanzen in der Arbeit von *Klein* und *Kisser* über Nitratassimilation[2]). Uns sind solche Fälle aus eigenen Beobachtungen auch bekannt; so wurde in unserem Laboratorium die Ammoniakausscheidung durch die Wurzeln von Wicke und Senf beobachtet, wenn den etiolierten Keimlingen von diesen Pflanzen größere Mengen von Nitrit gegeben wurden, als sie assimilieren konnten[3]). Darum können wir annehmen, daß in unserem Versuch mit älteren Erbsenkeimlingen zwei Ursachen die Ammoniakanhäufung und -ausscheidung begünstigen mußten: 1. Die Störung der Asparaginsynthese durch physiologisch saures Salz, 2. die Reduktion von HNO_3, welche mit NH_4NO_3 ausgeführt wurde, zum Ammoniak, ohne darauf folgende Synthese von Asparagin („reine Reduktion" nach *Warburg*).

Außer dem Einfluß von physiologisch sauren Salzen kann die Ammoniakausscheidung auch durch direkte Wirkung von Säuren hervorgerufen werden. Zum ersten Male haben wir diese Erscheinung im Jahre 1913 beobachtet, in einem Versuch mit den Keimlingen von gelben Lupinen, welche in eine Lösung von Schwefelsäure (0,0005 bis 0,0012 n) gesetzt wurden; bald trat die Erkrankung der Lupinen an Ammoniakvergiftung ein, und wenn eine größere Zahl von Pflanzen sich in einer Kristallisationsschale befand, wurde die Schwefelsäure durch ausgeschiedenes Ammoniak neutralisiert. Damals waren wir geneigt, von diesen Erscheinungen zuviel den individuellen Eigenschaften der Lupinen zuzuschreiben.

In den Jahren 1917 bis 1919 wurden in unserem Laboratorium einige Versuche angestellt, um den Einfluß der Reaktion des äußeren Mediums auf die Aufnahme von NH_3 und HNO_3 aus NH_4NO_3 zu beobachten. In den Versuchen mit Gerste wurde, wie es schien, die Verschiebung des Verhältnisses zwischen aufgenommenem NH_3 und HNO_3 erreicht[4]), aber die Versuche mit Erbsen haben gezeigt, daß hier die Erscheinungen der Ammoniakausscheidung teilnehmen; es sprechen dafür folgende Versuchsergebnisse:

---

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **111**, 171, 1920.

[2]) Sitzungsber. d. Wien. Akad. 1925.

[3]) Vgl. die Arbeit von *Dikussar*, Journ. f. landw. Wissensch. 1925 (russisch).

[4]) Z. B. unter dem Einfluß von Ansäuerung bis 0,0015 n wurden 50 mg Ammoniakstickstoff statt 64 und 33 mg Salpetersäurestickstoff statt 26 mg aufgenommen.

Erbsenkeimlinge, in NH_4NO_3-Lösung (0,05 proz.) gezogen:

Konzentration von HCl:		I 0,0015	II 0,00075	III 0,0010	IV 0,0025 n
Stickstoff aufgenommen	als NH_3	17,0	4,9	— 16,5	— 29,6 mg
	als HNO_3	27,3	26,7	19,4	3,4 „
		+ 44,3	+ 31,6	+ 2,9	— 26,2 mg

Die bei höheren Aciditätsgraden evident gewordene Ammoniakausscheidung läßt für andere Fälle (I und II) eine Depression der Ammoniakassimilation annehmen; im Falle III stehen die Pflanzen sehr nahe beim Stadium von „reiner Reduktion" (nach *Warburg*), die aufgenommene Salpetersäure wird zum größten Teile nur bis Ammoniak reduziert, Assimilation ist sehr gering. Im Falle IV wird auch die Reduktion durch Überschuß von Säure unterdrückt, und ausgeschiedenes Ammoniak ist meistens von anderem Ursprung, es bildet sich wegen der Depression von Asparaginbildung auf Kosten der stickstoffhaltigen Substanz der Keimlinge selbst.

Wir sehen also, daß bei gleichem Kohlehydratvorrat und gleicher Stickstoffernährung der Säurezusatz allein die großen Veränderungen im Stickstoffumsatz der Pflanze hervorrufen kann.

Um den Einfluß der Säure besser kennenzulernen, haben wir solche Versuche angestellt, in welchen die Säure nicht zu der Lösung von Ammoniumnitrat, sondern zum Wasser zugesetzt wird. Diese Versuche sind jetzt im Gange; vorläufig können wir folgendes mitteilen.

Konzentration von HCl:		0,0005	0,00075	0,0010 n
Erste Reaktion, auf NH_3 erschienen	bei Hafer	—*)	nach 19 Tagen	nach 12 Tagen
	bei Erbsen	nach 4 Tagen	„ 4 „	„ 3 „
Absterben der Pflanzen	bei Hafer	—	„ 20 „	„ 15 „
	bei Erbsen	„ 9—10 „	„ 7 „	„ 5 „
Änderung von p_H der Lösung	bei Hafer	3,3—5,0	3,1—5,1	2,9—5,1
	bei Erbsen	3,3—4,8	3,1—5,4	2,9—5,6

*) Während 20 Tagen der Versuchsdauer kein Ammoniak.

Wie schon auf Grund unserer Versuche mit physiologisch sauren Salzen zu erwarten war, sind die etiolierten Keimlinge von kohlehydratreichem Hafer viel mehr gegen Säurewirkung resistent, als die Keimlinge der Erbsen, und das Ammoniak in der Außenflüssigkeit erscheint im Falle von Hafer später.

Weiter muß die Ammoniakausscheidung quantitativ verfolgt werden.

Die Erscheinungen, welche bei p_H 2,9 bis 3,1 beobachtet werden, liegen gewiß schon in dem Gebiet der Pathologie; sie müssen aber von Pflanzenphysiologen berücksichtigt werden, weil die Veränderungen,

welche die Pflanzen selbst in der Reaktion des Nährsubstrats hervorrufen, oft zu pathologischen Verhältnissen führen; wir wollen nur ein Beispiel geben:

Zea Mays in Wasserkulturen (assimilierende Pflanzen).

	Stickstoffquelle:	$NaNO_3$	NH_4NO_3	NH_4Cl
Reaktion der Lösung (p_H)	zu Anfang	5,5	5,5	5,5
	nach 16 Tagen . . .	6,9	3,3	2,9 *)

*) Vgl. die oben erwähnte Mitteilung von *Prianischnikow* und *Domontowitsch* in Soil Science.

Zusammenfassung.

Aus allem, was uns bis jetzt über das Verhalten der Pflanzen gegen Ammoniumnitrat bekannt geworden ist, können wir folgende Schlüsse ziehen:

Aus den Lösungen von Ammoniumnitrat nehmen die normalen Pflanzen bedeutend schneller das Ammoniak als die Salpetersäure auf: die Nährlösung wird dabei desto saurer, je größer die Wurzelmasse ist, welche mit gewissen Volumen der Lösung in Berührung kommt.

Man bekommt aber andere Resultate, wenn man mit solchen Pflanzen arbeitet, welche nicht imstande sind, mit genügender Energie die organischen, stickstoffhaltigen Substanzen (Asparagin, Glutamin) auf Kosten von Ammoniak zu synthetisieren und welche geneigt sind, das Ammoniak in äußere Lösung auszuscheiden, sei es „eigenes Ammoniak", welches infolge der Oxydationsprozesse im Organismus sich bildet, sei es Ammoniak, welches infolge der Reduktion der dargereichten Salpetersäure entsteht.

Eine solche Störung von synthetischen Funktionen wird in folgenden Fällen beobachtet:

1. Wenn die Pflanzen den Kohlehydratvorrat ganz verbraucht haben (in diesem Falle ohne jeden äußeren Einfluß).

2. Auch bei nicht so stark ausgeprägtem Kohlehydratmangel, wenn die Stickstoffnahrung zu reichlich dargeboten wird.

3. Wenn bei relativem Kohlehydratmangel die synthetischen Funktionen durch physiologische Acidität beeinträchtigt werden.

4. Wenn die Pflanzen durch die Wirkung der freien Säuren leiden.

5. Wenn die Pflanzen der Wirkung der anästhesierenden Mittel unterworfen sind.

In allen solchen Fällen sind die Pflanzen nicht imstande, auf die Frage über den relativen Wert von Ammoniak und Salpetersäure dem Versuchsansteller eine richtige Anwort zu geben.

Einfluß von Stärkeinjektionen auf die Blutamylase.

(Zur Frage nach der Existenz sogenannter „Abwehrfermente" gegen Kohlehydrate.)

Von

Marie Magaram und **W. Engelhardt.**

(Aus dem Biochemischen Institut des Kommissariats für Volksgesundheit in Moskau.)

(Eingegangen am 15. Januar 1927.)

Mit 2 Abbildungen im Text.

Die Lehre von den „Abwehrfermenten" wurde von ihrem Begründer, *E. Abderhalden*, nicht nur auf eiweißabbauende Fermente beschränkt, sondern auch auf die kohlehydratspaltenden Fermente erstreckt.

In seinen Arbeiten mit *Brahm*[1]), mit *Kapfberger*[2]) und mit *Wildermuth*[3]) kommt *Abderhalden*, in Bestätigung früherer Versuche von *Weinland*[4]), zu dem Schluß, daß nach parenteraler Zufuhr von Rohrzucker das Serum der Versuchstiere die Eigenschaft gewinnt, dieses Disaccharid (und daneben auch Milchzucker) zu spalten. Es sollte eine Disaccharase neugebildet oder von den Zellen ins Blut abgegeben sein. Auf diese Arbeit folgte eine Reihe anderer, deren Autoren gleichfalls sich bemühten, das Auftreten von kohlehydratspaltenden Fermenten nach parenteraler Zufuhr von Polysacchariden nachzuweisen.

Die von verschiedenen Forschern erhaltenen Ergebnisse waren äußerst widerspruchsvoll. *Kumagai*[5]) glaubte die Befunde *Abderhaldens* zu bestätigen und hielt die Existenz kohlehydratspaltender Abwehrfermente für bewiesen. Diese Ansicht wurde weiter von *Röhmann*[6]) vertreten. Dagegen gelangten *Folkmar*[7]) und *Knaffl-Lentz*[8]) zu gerade entgegengesetzten Resultaten.

---

[1]) *E. Abderhalden* und *C. Brahm*, H.-S. **64**, 429, 1910.
[2]) *E. Abderhalden* und *G. Kapfberger*, H.-S. **69**, 23, 1910.
[3]) *E. Abderhalden* und *Wildermuth*, H.-S. **90**, 383, 1914.
[4]) *E. Weinland*, Zeitschr. f. Biol. **47**, 279, 1906.
[5]) *Kumagai*, diese Zeitschr. **57**, 380, 1913; **72**, 26, 1915.
[6]) *Röhmann*, ebendaselbst **84**, 382, 389, 1917.
[7]) *Folkmar*, ebendaselbst **76**, 1, 1916.
[8]) *Knaffl-Lentz*, H.-S. **90**, 110, 1922.

Es wurde in den zitierten Arbeiten zu den Injektionen meistens Rohrzucker angewandt, nur beigehend wurden von *Kumagai* Injektionen von Stärke vorgenommen. Es berichten sowohl *Kumagai* wie auch *Röhmann* über außerordentlich starkes Ansteigen der Blutamylase nach parenteraler Kohlehydratzufuhr. Jedoch lassen ihre Zahlen an eine Beteiligung von Bakterien denken. Es ist nämlich aus dem Text nicht ersichtlich, daß etwaige Antiseptica angewandt wurden (nur die Stärkelösung wurde vorher mit Toluol durchgeschüttelt), und die erhaltenen Zahlen sind ganz unwahrscheinlich hoch: eine Verdünnung des Blutes, $1 : 10^{-13}$, vermochte binnen 24 Stunden 50 mg Stärke zu spalten. Das läßt sich wohl kaum anders als durch Versuchsfehler erklären.

Die Ergebnisse *Röhmanns* und *Kumagais*, betreffend des Auftretens von Invertase im Blute wurden von *Knaffl-Lentz* nicht bestätigt, und *Folkmar* konnte auch keine Verstärkung der amylolytischen Fähigkeit des Blutes beobachten.

In vorliegender Arbeit suchten wir eine Nachprüfung der Frage zu unternehmen unter Anwendung einer genaueren quantitativen Methode der Amylasebestimmung.

Methodisches.

Zur Amylasebestimmung bedienten wir uns der Methode von *Engelhardt* und *Gertschuk*[1]). Jeder Versuch wurde stets in zwei Parallelbestimmungen ausgeführt, nämlich so, daß die beiden Blutproben (0,02 ccm) zwei einzelnen Bluttropfen entnommen wurden.

Alle Versuche wurden unter Puffer- und Toluolzusatz mit *Merck*scher löslicher Stärke angestellt. Dieselbe Stärke diente auch zu den Injektionen. Die für die Bestimmung nötigen Blutmengen sind so gering, daß es uns ohne jegliche Schwierigkeit möglich gewesen ist, tägliche Untersuchungen durchzuführen und inzwischen noch bis sechsmal täglich Blutproben zu entnehmen.

Die Zahlen sämtlicher Tabellen geben die Differenz, in Milligrammen Glucose ausgedrückt, zwischen dem Reduktionswert des Versuchs (2 Stunden bei 37°) und desjenigen der Kontrolle an.

Bei täglicher Untersuchung stellte es sich bald heraus, daß auch bei normalen Kaninchen die Blutamylase bedeutende Schwankungen aufweist. Die Größe dieser Schwankungen kann man aus den weiter unten angeführten Kurven (Abb. 1) ersehen. Als Ursache dieser Schwankungen dachten wir in erster Linie an einen Zusammenhang mit der Verdauung [vgl. *Abderhalden* und *Rathsmann*[2])] und prüften nach, ob die Schwankungen im nüchternen Zustande nicht geringer werden bzw. ob sie nicht mit reichlicher Einnahme von kohlehydrathaltiger Nahrung verbunden sind. Solch ein Zusammenhang konnte aber nicht festgestellt werden. Als Beispiel seien einige diesbezügliche Versuche angeführt.

---

[1]) *Engelhardt* und *Gertschuk*, diese Zeitschr. **167**, 43, 1926.

[2]) *Abderhalden* und *Rathsmann*, H.-S. **71**, 367, 1911.



Tabelle I.

Kaninchen Nr.	124	25	20	25	124	44
Nüchtern	0,272	0,221	0,140	0,107	0,328	0,252
Während des Essens	—	0,211	0,149	—	—	—
Erste halbe Stunde nach dem Essen	—	0,196	0,161	0,142	—	—
Erste Stunde nach dem Essen	0,238	—	—	—	0,326	0,247
Zweite „ „ „ „	—	0,202	0,121	0,138	0,261	0,252
Dritte „ „ „ „	0,247	—	—	0,149	—	—
Vierte „ „ „ „	—	0,178	0,123	—	0,247	0,202
Weiter	—	—	—	0,173	—	—

Wir sehen, daß die Tagesschwankungen ganz unregelmäßig, ohne Zusammenhang mit der Nahrung, vor sich gehen. Meistens betragen sie etwa 10 Proz. zu beiden Seiten vom Mittelwert, es kommt aber auch vor, daß Unterschiede von über 60 Proz. zwischen Maximum und Minimum auftreten (0,107 und 0,173).

Diese große Unbeständigkeit der Amylasezahlen bei ein und demselben Tiere an verschiedenen Tagen und sogar während eines Tages macht es sehr schwer, über den Einfluß äußerer Faktoren, in unserem Falle der Stärkeinjektionen, zu urteilen.

Zu den Injektionen wurde, wie oben bemerkt, *Merck*sche lösliche Stärke in Mengen von etwa 10 ccm 4proz. wässeriger Lösung angewandt. Das Einführen geschah stets intravenös.

Die Tiere vertragen die Injektionen ohne jegliche äußere Zeichen. Die Einspritzungen wurden in Abständen von etwa 5 bis 6 Tagen wiederholt, im ganzen erhielten die Tiere bis fünf Injektionen. Amylasebestimmungen wurden 5 Tage vor Anfang, während der Injektionen und etwa 2 Wochen nach der letzten Injektion täglich durchgeführt. Außerdem wurden in einer anderen Versuchsserie wiederholt Bestimmungen kurz bevor, sofort nach den Injektionen und weiter in kurzen Intervallen während des ganzen Injektionstages ausgeführt. Stets liefen Parallelbestimmungen an normalen Kaninchen mit.

Erst werden wir die Resultate der Amylasebestimmung unmittelbar nach den Injektionen zusammenstellen (s. Tabelle II).

Tabelle II.

Kaninchen Nr.	76	76	76	76	76	103	103	103	103	71
Injektion:	Erste	Zweite	Dritte	Vierte	Physiol. NaCl	Erste	Zweite	Dritte	NaCl	Zweite
Zeit der Blutentnahme:										
Vor der Injektion	0,216	0,255	0,144	0,227	0,198	0,230	0,250	0,272	0,234	0,185
Sofort nach d. Injektion	0,198	0,234	0,142	0,223	0,174	0,227	0,275	0,230	0,254	0,175
Nach 30 Minuten	0,207	0,137	0,153	0,229	0,166	0,203	0,241	0,236	0,248	0,137
„ 1 Stunde	0,210	0,133	0,149	0,198	0,162	0,250	0,230	0,207	0,230	0,164
„ 6 Stunden	0,169	0,147	0,173	0,209	0,165	0,242	0,191	0,203	0,236	0,154

Die Zahlen weisen Schwankungen auf, die in demselben Größenbereich liegen und ebenso unregelmäßig sind, wie bei normalen Kaninchen.

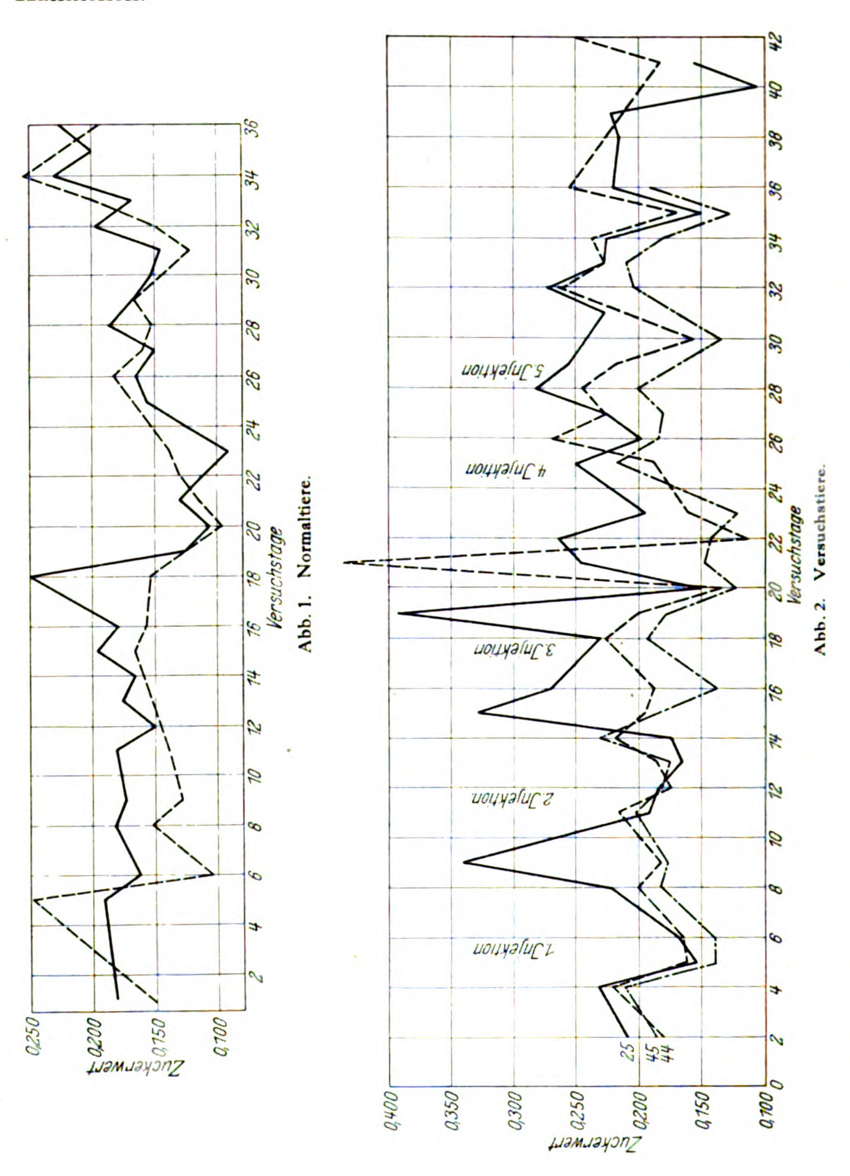


Abb. 1. Normaltiere.

Abb. 2. Versuchstiere.

Während also *Abderhalden* bei intravenöser Injektion von Rohrzucker bereits nach 15 Minuten das Auftreten der Spaltungsfähigkeit

des Serums beobachtete, konnten wir keinen solchen Einfluß der Stärkeinjektionen wahrnehmen.

Wenden wir uns jetzt den Veränderungen zu, welche die Blutamylase bei wiederholten Injektionen von Tag zu Tag aufweist, so sehen wir uns auch hier gezwungen, einzugestehen, daß diese Schwankungen weder in irgend einem Maße in Zusammenhang mit den Injektionen stehen, noch daß sie ein regelmäßiges Ansteigen des Amylasewertes erkennen lassen. Der Übersichtlichkeit wegen geben wir die Resultate einer solchen Versuchsserie direkt in Kurvenform wieder. Auf Abb. 2 sind die Resultate der Amylasebestimmungen an drei Versuchskaninchen angeführt, auf Abb. 1 haben wir die zur gleichen Zeit ausgeführten Bestimmungen an zwei Normaltieren wiedergegeben. Alle drei Versuchstiere erhielten die Injektionen an ein und demselben Tage.

Die Kurven der Kaninchen Nr. 45 und 44 weisen prinzipiell genau den gleichen Charakter auf wie diejenigen der Kontrolltiere. Der weit aus der Reihe fallende Wert beim Kaninchen Nr. 44 am 21. Versuchstage kommt uns wenig wahrscheinlich vor und wäre vielleicht durch irgend einen Versuchsfehler (etwa hineingelangte Speichelspuren) zu erklären. Abgesehen von diesem einen Sprunge weisen die Kurven 44 und 45 weder regelmäßige Schwankungen auf, die in Zusammenhang mit den Injektionen gebracht werden konnten, noch irgend einen systematischen Gang.

An der Kurve 25 sehen wir während der ersten Zeit drei sehr schroffe Schwankungen, später werden aber die Schwankungen kleiner und die Kurve zeigt sogar eine Tendenz, etwas zu sinken. Dies kurzdauernde Aufsteigen des Amylasewertes in Zusammenhang mit den Stärkeinjektionen zu bringen, und als eine „Abwehrmaßnahme" des Organismus zu betrachten, halten wir schon deswegen für unmöglich, weil dieser Aufstieg einmal am dritten Tage, ein andermal am vierten, dann aber schon am nächsten Tage nach der Injektion auftrat.

Fassen wir die Ergebnisse unserer Versuche zusammen, so kommen wir zu folgenden Schlüssen:

1. Der Amylasewert des Kaninchenblutes schwankt bei normalen Tieren während ein und desselben Tages sowohl wie von Tag zu Tag nicht unbeträchtlich. Die Schwankungen können nicht in Zusammenhang mit der Nahrungseinnahme gebracht werden.

2. Nach Stärkeinjektionen, sowohl einzelnen wie auch wiederholten, weist die Blutamylase keine regelmäßigen Veränderungen auf, weder während des Tages der Injektion, noch in den darauffolgenden Tagen.



Über einige Adsorptionserscheinungen an Silberjodid.

Von

A. Frumkin und A. Obrutschewa.

(Aus dem Karpow-Institut für Chemie, Moskau.)

(Eingegangen am 21. Januar 1927.)

Mit 5 Abbildungen im Text.

Einleitung.

Vor kurzer Zeit hat der eine von uns[1]) eine Theorie entwickelt, die die Deutung der Beeinflussung der Adsorbierbarkeit von Neutralmolekülen durch das elektrische Feld an der adsorbierenden Oberfläche erlaubt. Diese Beeinflussung tritt besonders deutlich zutage bei der Adsorption von organischen Stoffen an einer Hg-Oberfläche, wie dies durch Abb. 1 illustriert wird[2]). $\varDelta$ ist hier die durch die Ad-

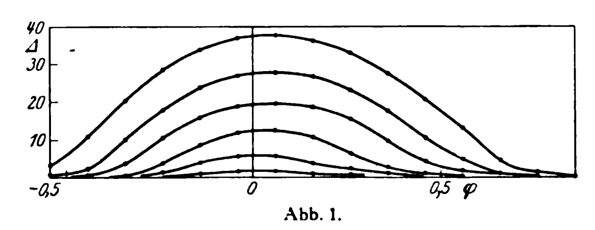


Abb. 1.

sorption von Capronsäure bewirkte Erniedrigung der Grenzflächenspannung an der Trennungsfläche Hg/0,3 n KNO_3 in absoluten Einheiten, φ die Potentialdifferenz Lösung/Hg in Volt, wobei der Nullwert von φ dem Maximum der Elektrokapillarkurve von 0,3 n KNO_3 entspricht; in diesem Punkte ist also in Abwesenheit von organischen Molekülen die Ladungsdichte der Hg-Oberfläche gleich Null. Die obere Kurve bezieht sich auf 0,07 n Capronsäure, die nächsten auf 0,035 n, 0,0175 n usw. Wie ersichtlich, hat jede von den Kurven bei einem φ-Wert, welcher unweit von Null liegt, aber in der Richtung

[1]) *Frumkin*, Zeitschr. f. Phys. **35**, 792, 1926.

[2]) Nach Messungen von Frl. *Kulwarskaja*.

negativer Ladungen der Hg-Oberfläche, also positiver φ-Werte, um etwa 0,045 verschoben ist, ein Maximum; die Adsorbierbarkeit ist also dann am größten, wenn die ursprüngliche Ladung der Hg-Oberfläche nahezu Null ist, oder richtiger, einen kleinen negativen Wert hat. Entfernt man sich von diesem Werte, so fällt die Adsorbierbarkeit erst langsam und dann rasch ab. Nach der anfangs erwähnten Theorie sind diese Verhältnisse durch die Verschiedenheit der Dielektrizitätskonstanten der Moleküle des Wassers und der gelösten organischen Substanz zu erklären: Die organischen Moleküle mit der kleineren D. K. werden vom Felde aus der Oberflächenschicht ausgestoßen, die Wassermoleküle mit der größeren D. K. aber hineingezogen.

Dieser Effekt ist dem Quadrat der P.-D. Lösung/Quecksilber proportional; dazu kommt noch ein Effekt, der linear mit der P.-D. variiert und der durch die Dipolwirkung der adsorbierten Moleküle bedingt ist: Laden diese die Hg-Oberfläche bei der Adsorption positiv auf, so wird eine schon vorhandene negative Ladung die Adsorption begünstigen und umgekehrt. Bei großen Feldstärken überwiegt aber der dem Quadrat der P.-D. proportionale Effekt und es tritt immer Adsorptionshemmung ein. Mathematisch läßt sich die Theorie unter gewissen vereinfachenden Voraussetzungen im folgenden Satze zusammenfassen. Geht man von dem Potential $\varphi_{\text{max.}}$ aus, welches der maximalen Adsorbierbarkeit entspricht, so ist nach Einführung einer P.-D. gleich φ die Konzentration der Lösung im Verhältnis

$$k = e^{\frac{(C - C')\,(\varphi - \varphi_{\text{max.}})^2 S}{2RT}} \tag{1}$$

zu vergrößern, damit die adsorbierte Menge konstant bleibt, wobei den Buchstaben C, C' und S folgende Bedeutung zukommt: C ist die Kapazität der Doppelschicht pro Flächeneinheit in Abwesenheit von organischen Molekülen, C' dieselbe Größe nach der Sättigung der Oberfläche mit dem adsorbierten Stoff, und S ist die Fläche, welche von einem Mol der adsorbierten Substanz bedeckt wird, vollständige Sättigung der Oberflächenschicht vorausgesetzt[1]). Die Größe $\varphi_{\text{max.}}$ ist gleich $-\frac{C'}{C - C'}\varphi_N$, wo mit φ_N die P.-D. bezeichnet werden soll, welche sich zwischen Lösung und Hg einstellt, wenn die Hg-Oberfläche ungeladen, die Oberflächenschicht aber mit den adsorbierten Molekülen bedeckt ist. Ist diese durch die Differenz zwischen den Dipolwirkungen der adsorbierten Moleküle und denen des Wassers bedingte P.-D. gleich Null, so ist auch $\varphi_{\text{max.}} = 0$, und maximale Adsorption tritt an einer

[1]) Gleichung (1) kann durch eine einfache Umformung aus der Gleichung (5) der zitierten Abhandlung gewonnen werden.

ursprünglich ungeladenen Oberfläche ein; anderenfalls wird $\varphi_{max.}$ von Null verschieden sein, bleibt aber immer klein, da C' klein gegen C ist.

In der zitierten Abhandlung wurde gezeigt, daß diese Theorie die beobachteten Elektrokapillarkurven mit genügender Genauigkeit wiedergibt, die Übereinstimmung kann durch Einführung einiger weiterer Voraussetzungen in die Theorie noch verbessert werden. Gleichung (1) muß aber dann durch eine wesentlich kompliziertere ersetzt werden. In dieser Abhandlung werden wir nur von der vereinfachten Theorie Gebrauch machen.

Es lag nun nahe, zu untersuchen, ob eine ähnliche Abhängigkeit der adsorbierten Menge von der P.-D. Lösung/adsorbierende Oberfläche auch an anderen Systemen beobachtet werden kann.

Als geeignetes Untersuchungsobjekt erwies sich Jodsilber[1]), da die P.-D. Lösung/Jodsilber wegen dessen geringer Löslichkeit durch Variation der Silberionenkonzentration in sehr weiten Grenzen variiert werden kann. Allerdings läßt sich die P.-D. zwischen Lösung und einem AgJ-Niederschlag nicht direkt bestimmen; seit der grundlegenden Arbeit von *F. Haber*[2]) wissen wir aber, daß eine P.-D. dieser Art von der Ag-Ionenkonzentration genau so abhängt, wie die P.-D. Lösung/Silbermetall. Weiterhin wissen wir aus den Arbeiten von *Lottermoser* und *Fajans*[3]), daß in Gegenwart von überschüssigem $AgNO_3$ gefälltes AgJ durch $Ag^{\cdot}$-Ionen positiv, in Gegenwart von überschüssigem KJ gefälltes aber durch J'-Ionen negativ aufgeladen wird[4]). Der Punkt, der einem Nullwert der Ladungsdichte entspricht, muß also mit dem Äquivalenzpunkt zusammenfallen oder wenigstens unweit von diesem liegen, in der Nähe des Äquivalenzpunktes muß dementsprechend auch das Adsorptionsvermögen eines AgJ-Niederschlags für organische Nichtelektrolyte einen Maximumwert erreichen.

---

[1]) Vorläufige Mitteilung siehe Nature **117**, 790, 1926.

[2]) Ann. d. Phys. (4) **26**, 927, 1908.

[3]) *Lottermoser* und *Rothe*, Zeitschr. f. phys. Chem. **62**, 359, 1908; *Lottermoser*, *Seifert* und *Forstmann*, Kolloid-Zeitschr. **36**, 230, 1925; *Fajans* und *Beckerath*, Zeitschr. f. phys. Chem. **97**, 478, 1921; *Fajans* und *Frankenburger*, **105**, 255, 1923; *Fajans* und *Hassel*, Zeitschr. f. Elektrochem. **29**, 495, 1923; *Fajans* und *Wolff*, Zeitschr. f. anorg. Chem. **137**, 221, 1924; *Hassel*, Kolloid-Zeitschr. **34**, 305, 1924; siehe auch *Beekley* und *Taylor*, Journ. phys. Chem. **29**, 941, 1925.

[4]) Soviel uns bekannt ist, hat keiner von den Forschern, die sich mit diesen Problemen befaßt haben, auf den Zusammenhang zwischen der Adsorption von $Ag^{\cdot}$ und J' durch AgJ und der Ausbildung der thermodynamisch definierten P.-D. Lösung/AgJ hingewiesen; dieser Zusammenhang, der unmittelbar auf die Analogie mit den kapillarelektrischen Erscheinungen an der Hg-Oberfläche hinweist, war der Ausgangspunkt aller unserer Betrachtungen. Siehe auch *Frumkin* und *Obrutscheva*, Zeitschr. f. anorg. Chem. **158**, 84, 1926.

Titrationskurven.

Um diesen Schluß nachzuprüfen, wählten wir zuerst folgende Versuchsanordnung. Wir titrierten 20 ccm einer 0,5 n $AgNO_3$-Lösung, die außerdem 0,05 n in bezug auf HNO_3 war und eine kapillaraktive organische Substanz enthielt mit einer — dieselben Zusätze in denselben Konzentrationen enthaltenden — etwa 0,5 n KJ-Lösung und bestimmten die Konzentration der organischen Substanz, die in den verschiedenen Stadien des Titrationsvorgangs in Lösung blieb, vom Niederschlag also nicht adsorbiert wurde. Als kapillaraktive Substanzen kamen zur Verwendung: sekundärer Octylalkohol, Nonyl-, Capryl- und Heptylsäure. Qualitativ beobachtete man in allen Fällen dieselben Erscheinungen; für genauere Messungen erwies sich aber der Alkohol wegen seiner großen Flüchtigkeit als ungeeignet. Auch mit Säuren beobachtet man bei längerem Arbeiten Verluste infolge ihrer Verflüchtigung, diese waren aber nicht so groß, als daß sie einen wesentlichen Einfluß auf die Resultate der Versuche haben könnten. Setzt man die organischen Säuren zu einer neutralen $AgNO_3$-Lösung hinzu, so fällt das entsprechende Silbersalz aus; die $AgNO_3$-Lösung mußte deshalb in der angegebenen Weise mit HNO_3 angesäuert werden; um die $H^{\cdot}$-Ionenkonzentration während des ganzen Versuchs konstant zu halten, wurden entsprechende HNO_3-Mengen auch zu den anderen Lösungen, die zur Verwendung kamen, hinzugefügt. Die Konzentration der kapillaraktiven Substanz in der Lösung bestimmten wir durch Oberflächenspannungsmessungen; nach einigen orientierenden Versuchen nach den Methoden von *Wilhelmy* und der des maximalen Blasendrucks gingen wir zu einem Stalagmometer mit einem 65,5-Tropfen gleichen Wasserwert über. In der Nähe des Äquivalenzpunktes wurde die KJ-Lösung in Portionen zu 0,01 ccm aus einer Mikrobürette zugesetzt; nach jeder Zugabe wurde 3 Minuten geschüttelt und wenn KJ im Überschuß vorhanden war, so daß der Niederschlag sich schlecht absetzte, zentrifugiert.

Einige typische Kurven, die wir bei diesen Versuchen erhalten haben, sind in Abb. 2 wiedergegeben. Wie ersichtlich, zeigt die Tropfen-

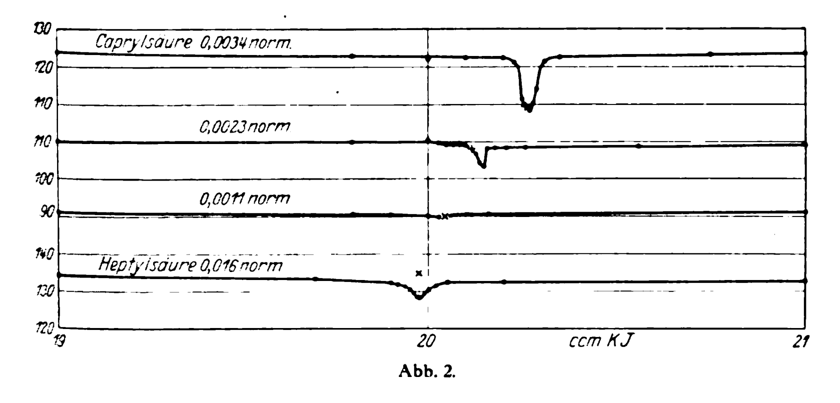


Abb. 2.

zahl in der Nähe des mit einem Sternchen auf jeder Kurve bezeichneten Äquivalenzpunktes ein scharf ausgeprägtes Minimum, welches einem Minimum der Konzentration der organischen Säure, d. h. einem

Maximum der adsorbierten Menge entspricht[1]). Bei steigender Verdünnung (dritte Kurve) verschwindet der Effekt, was mit dem eigentümlichen Gange der Adsorptionskurven zusammenhängt; weiter unten werden wir auf diesen Umstand noch zurückkommen. Die Titrationskurven kann man auch in umgekehrter Richtung durchlaufen; wenn man von der Silberseite ausgeht und dann auf diese zurückkehrt, so beobachtet man auf dem Rückwege die gleiche oder eine etwas höhere Tropfenzahl wie auf dem Hinwege, in einiger Entfernung vom Minimum aber stets eine um 1 bis 2 Tropfen niedrigere; die Kurve wird also etwas flacher und verschiebt sich nach unten. Einerseits geht also ein Teil der organischen Säure durch Verflüchtigung verloren, andererseits aber vermindert sich, wohl infolge einer Teilchenvergrößerung, die Adsorptionskraft des Niederschlags. Zu verschiedenen Zeiten mit gleichartig zusammengesetzten Lösungen aufgenommene Kurven zeigen keine quantitative Übereinstimmung; das Adsorptionsvermögen der Niederschläge variiert in ziemlich weiten Grenzen, ohne daß man die dafür verantwortlichen Faktoren feststellen könnte. Auf den Heptylsäurekurven ist das Minimum wegen der größeren Löslichkeit der Heptylsäure viel weniger ausgeprägt als auf den Caprylsäurekurven. Die Lage des Äquivalenzpunktes bestimmten wir nach *Gay-Lussac*; wir kamen zunächst zu dem Schluß, daß das Minimum der Tropfenzahl um etwa 0,01 bis 0,02 ccm gegen den Äquivalenzpunkt nach der Jodseite verschoben ist (siehe z. B. die zweite Kurve der Abb. 2); genauere potentiometrische Versuche, zu denen wir später übergingen, zeigten aber, daß dieser Schluß falsch war und daß der Minimumpunkt in Wirklichkeit nach der Silberseite verschoben ist. Die Diskrepanz rührt wohl daher, daß in den beschriebenen Versuchen die Titration zu schnell ausgeführt wurde und sich das Gleichgewicht zwischen Niederschlag und Lösung nicht vollständig einstellte.

Potentiometrische Titration.

Die potentiometrischen Versuche, die wir anstellten, um diese Frage zu entscheiden, führten wir mit ähnlich zusammengesetzten Lösungen, wie oben angegeben, aus; nur wurde in der Nähe des Äquivalenzpunktes nicht eine 0,5 n, sondern eine 0,05 n $AgNO_3$ bzw. KJ-Lösung in Portionen zu 0,01 ccm zugesetzt. In dem Gläschen, in dem die Titration ausgeführt wurde, befand sich ein mittels eines Elektromotors angetriebener Rührer:

---

[1]) Nach einer Beobachtung von *Fajans* und *Frankenburger*, l. c., S. 265, haben AgBr-Niederschläge die Eigenschaft, in der Nähe des Äquivalenzpunktes beim Durchschütteln der wässerigen Lösung mit Äther die Äthertröpfchen zu umhüllen, während in genügender Entfernung vom Äquivalenzpunkte der Niederschlag nach dem Durchschütteln rasch zu Boden sinkt. Es ist sehr wahrscheinlich, daß es sich in diesem Falle um eine der von uns beschriebenen wesensverwandte Erscheinung handelt.

nach jedem Zusatze wurde 20 Minuten gerührt und unter stetiger Rührung das Potential abgelesen; letzterer Umstand ist wesentlich, da anderenfalls in der Nähe des Äquivalenzpunktes wegen der viel zu geringen Konzentration der potentialbestimmenden Ionen die Silberelektrode sich nicht einstellt; bei ständigem Rühren spielt der Niederschlag, der verhältnismäßig große Mengen $Ag^{\cdot}$- oder J'-Ionen adsorbiert, die Rolle eines Puffers, wie das noch weiter unten auseinandergesetzt wird, und die Potentialbestimmung wird möglich. Die Silberelektrode war ein mit HNO_3 angeätzter Silberdraht; die Flüssigkeit im Titriergefäß war mittels eines Hebers, der mit 0,25 n KNO_3 + 0,05 n HNO_3 (d. h. mit einer Lösung, die im wesentlichen dieselbe Zusammensetzung wie die Lösung im Titriergefäß in der Nähe des Äquivalenzpunktes hatte), mit einem Zwischengefäß mit gesättigter NH_4NO_3-Lösung und einer Normalkalomelelektrode verbunden. Die Potentialablesung erfolgte mittels eines Binantenelektrometers mit Spiegel und Skala.

Eine typische Kurve, die nach dieser Methode mit Lösungen, die Caprylsäure in 0,004 n Konzentration enthielten, erhalten wurde, ist in Abb. 3 angeführt. Die Abszissen der Abb. 3 und 4 geben die P.-D.

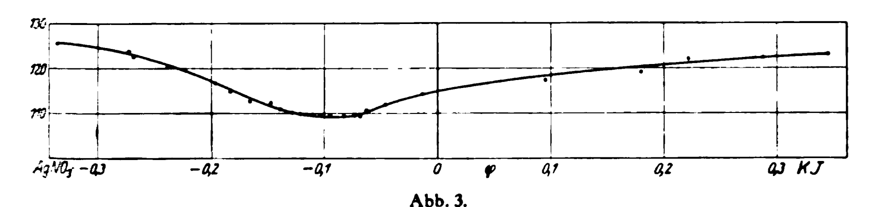


Abb. 3.

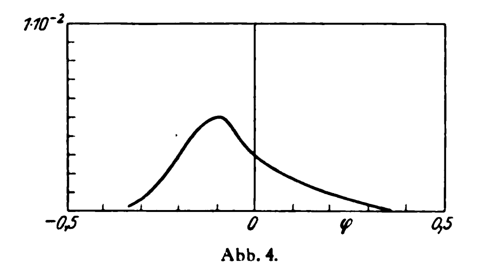


Abb. 4.

Lösung/Niederschlag an, wobei der Nullpunkt dem Äquivalenzpunkt entspricht (0,062 Volt, gemessen gegen eine Normalkalomelelektrode; das dem Äquivalenzpunkt entsprechende Potential der Ag-Elektrode bestimmten wir in der üblichen Weise aus der Kurve der potentiometrischen Titration einer 0,25 n KNO_3-Lösung, die $AgNO_3$ in 0,001 n Konzentration enthielt). Die Ordinaten der Abb. 3 geben die Tropfenzahlen, die der Abb. 4 die aus den beobachteten Tropfenzahlen berechneten adsorbierten Mengen in Molen Caprylsäure pro Mol AgJ an. Bei dieser Berechnung wurde an den Beobachtungsresultaten noch eine Korrektur angebracht, die der Verflüchtigung der Caprylsäure während der sehr beträchtlichen Versuchsdauer Rechnung tragen

sollte; dieselbe wurde aus den am Anfang und am Ende des Versuchs bei dem größten $AgNO_3$-Überschuß, der zur Verwendung kam, beobachteten Tropfenzahlen (125½ und 122½ Tropfen) ermittelt; allerdings macht diese Korrektur die Berechnung der adsorbierten Menge etwas unsicher. Beim Vergleich der Kurve der Abb. 4 mit denen der Abb. 1, stößt man auf bemerkenswerte Unterschiede: Die Kurve der Abb. 4 ist nämlich in bezug auf den Punkt, der der maximalen Adsorption entspricht, ausgesprochen asymmetrisch und, was besonders bemerkenswert ist, dieser Punkt ist gegen den Äquivalenzpunkt nach der Silberseite, d. h. in der Richtung positiver Ladungen der Oberfläche, verschoben, $\varphi_{max.} = -0{,}10$ (man bedenke, daß φ die P.-D. Lösung/Niederschlag angibt; in drei anderen Versuchen fanden wir unabhängig von der Titrationsrichtung: $\varphi_{max.} = -0{,}09$, $-0{,}11$, $-0{,}09$, im Durchschnitt $-0{,}10$, oder 0,16 für das Potential der in die Lösung tauchenden Silberelektrode gegen eine Normalkalomelelektrode gemessen). Diese Verschiebung ist also der im Falle einer adsorbierenden Quecksilberoberfläche beobachteten gerade entgegengerichtet. Man könnte diese Tatsache auf zweierlei Weise deuten: entweder fällt der Nullpunkt der Ladungsdichte mit dem Äquivalenzpunkt in Wirklichkeit nicht zusammen, sondern ist merklich nach der Silberseite verschoben, oder es ladet die organische Säure den AgJ-Niederschlag nicht positiv, wie Hg, sondern negativ auf, was auf eine verschiedene Orientierung des polaren Anteils des Moleküls in beiden Fällen hinweisen würde. Wir hoffen, daß weitere Versuche diese Frage aufklären werden.

Die Adsorptionskurven.

Um das Studium des Systems AgJ/organische Säure zu vervollständigen, nahmen wir noch eine Reihe von Adsorptionskurven bei verschiedenen Bedingungen auf. Die folgende Methode erwies sich nach zahlreichen Vorversuchen als die brauchbarste, da sie ein schnelles Arbeiten ermöglicht, so daß die Gefahr der Veränderung der Größe der Niederschlagsoberfläche und der Verflüchtigung der Säure auf ein Minimum reduziert wird.

1. Bestimmung der Kurve der maximalen Adsorption.

Ein aus 20 ccm einer angesäuerten 0,5 n $AgNO_3$-Lösung und 20 ccm einer ebenfalls angesäuerten 0,5 n KJ-Lösung hergestellter AgJ-Niederschlag wurde so lange mit einer mit Caprylsäure nahezu gesättigten 0,25 n KNO_3 + 0,05 n HNO_3-Lösung ausgewaschen, bis die Tropfenzahl der Lösung nach Einstellung des Adsorptionsgleichgewichts sich dem Werte 145, welcher der Sättigung mit Caprylsäure entspricht, genügend näherte. Während der Sättigung setzten wir zu unserem System von Zeit zu Zeit kleine Mengen $AgNO_3$- oder KJ-Lösung so lange hinzu, bis ein Minimum der Tropfenzahl erreicht wurde, und nach vollendeter Sättigung ver-

gewisserten wir uns noch einmal, daß die $Ag^{\cdot}$-Ionenkonzentration in der Lösung den dem Maximum der adsorbierenden Wirkung entsprechenden Wert hatte. Jetzt brachten wir das Volumen der Lösung auf 30 ccm, fügten zum System 10 ccm einer 0,25 n KNO_3 + 0,05 n HNO_3-Lösung hinzu, titrierten wieder bis zum Minimum der Tropfenzahl (meistens ist übrigens die gleich nach dem Verdünnen beobachtete Tropfenzahl von der dem Minimum entsprechenden nicht merklich verschieden) und berechneten aus der Tropfenzahl die Menge Caprylsäure, die vom Niederschlag bei der Verdünnung frei gemacht wurde. Die für diese Berechnung notwendige Kurve, die die Tropfenzahl der wechselnde Mengen Caprylsäure enthaltenden 0,25 n KNO_3- + 0,05 n HNO_3-Lösungen in Abhängigkeit von ihrem Caprylsäuregehalt angibt, bestimmten wir einmal für alle mit größter Sorgfalt. Die beschriebene Operation wurde so lange fortgesetzt, bis der Niederschlag keine meßbaren Mengen Caprylsäure mehr abgab; zu diesem Zwecke mußte man bis zu einer etwa 75 betragenden Tropfenzahl heruntergehen; aus verdünnteren Lösungen adsorbiert AgJ praktisch keine Caprylsäure. Aus den Mengen Caprylsäure, die der Niederschlag bei jeder Verdünnung abgab, konnte man leicht die von ihm im Gleichgewicht mit verschieden konzentrierten Lösungen zurückgehaltenen Mengen berechnen.

Die mit sechs verschiedenen Niederschlägen erhaltenen Kurven sind auf der linken Seite der Abb. 5 angeführt, wobei die Abszissen die Konzentrationen der Caprylsäure, die Ordinaten die adsorbierten Mengen in Molen Caprylsäure pro Mol AgJ angeben. Wie man sieht, haben die verschiedenen Niederschläge ein recht verschiedenes Adsorptionsvermögen; die adsorbierende Oberfläche ist also verschieden groß, die Form der Adsorptionskurve bleibt aber in allen Fällen im wesentlichen dieselbe. Dieses kann man noch deutlicher machen, wenn man den Maßstab der Ordinaten so verändert, daß die einer bestimmten Konzentration, etwa 0,0045 n, entsprechenden Punkte der Kurven zusammenfallen, dann legen sich alle anderen Punkte mit wenigen Ausnahmen auf *eine* Kurve; es verbleiben nur verhältnismäßig geringe individuelle Abweichungen[1]). In verdünnteren Lösungen ist die Adsorption unmerklich klein, beginnt aber von einer bestimmten Konzentration an zuerst schnell und dann langsamer zu wachsen; wie der eine von uns gezeigt hat[2]), ist ein solcher Gang der Adsorptionskurve im Falle starker, zwischen den adsorbierten Molekülen wirkender Attraktionskräfte zu erwarten und wird auch bei der Adsorption der höheren Fettsäuren an der Trennungsfläche Luft/Lösung beobachtet. Der weitere Verlauf der Adsorptionskurven der Abb. 5 ist aber schwerer zu deuten, denn bei höheren Konzentrationen zeigen die Kurven einen zweiten Inflexionspunkt. Man könnte zuerst denken, daß es sich um

[1]) Das zur Berechnung der Kurven der Abb. 5 benutzte Zahlenmaterial wird in der demnächst erscheinenden russischen Abhandlung (Mitteilungen des Karpow-Instituts für Chemie Nr. 6), zusammen mit der graphischen Darstellung einer solchen Umrechnung, angeführt werden.

[2]) *Frumkin*, Zeitschr. f. phys. Chem. **116**, 479, 1925.

eine kapillare Kondensation der Caprylsäure in den Poren des Niederschlags handelt, die bei der Näherung au den Sättigungspunkt einsetzt,

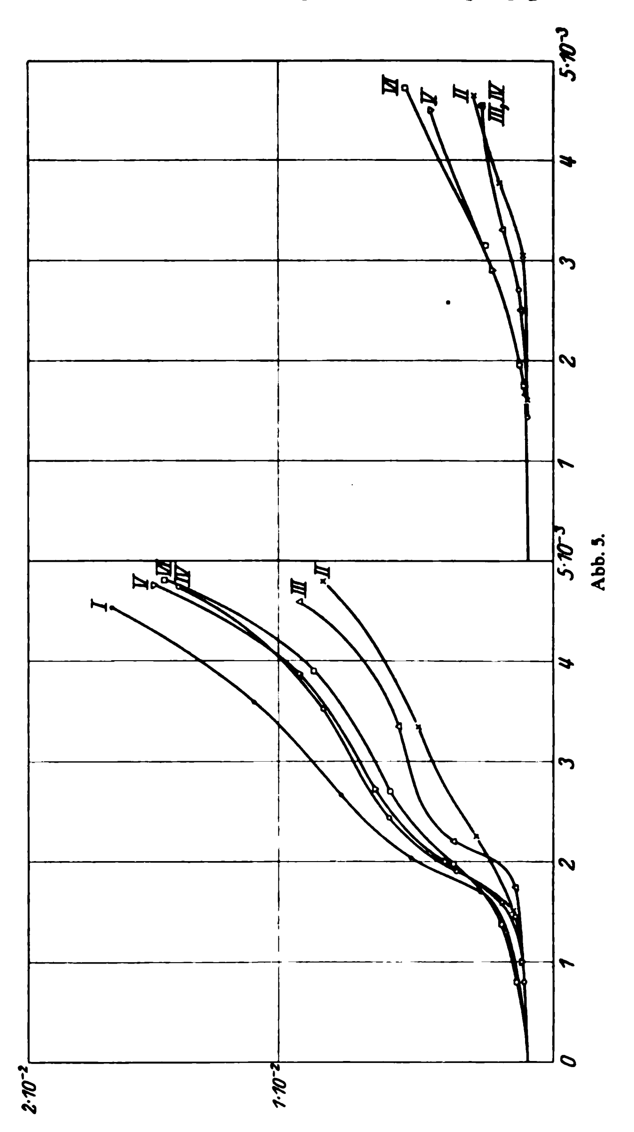


Abb. 5.

wie dieses z. B. bei der Adsorption von Wasserdampf in manchen Fällen beobachtet wurde[1]). In diesem Falle sollte aber die Er-

[1]) *Bray* und *Draper*, Proc. Nat. Acad. of Sc. **12**, **195**, **1926**.

scheinung bei den Niederschlägen mit der größeren Oberfläche, die also feinporiger sind, stärker ausgesprochen sein; in Wirklichkeit besteht ein solcher Zusammenhang nicht. Vielleicht könnte man die beobachteten Kurven als das Resultat der Superposition zweier Adsorptionskurven deuten, dem Umstand entsprechend, daß die AgJ-Oberfläche Adsorptionszentren zweierlei Art besitzt; jedoch möchten wir auf der Richtigkeit dieser Erklärung nicht bestehen. Außer den Caprylsäurekurven haben wir noch einige Adsorptionskurven für Heptylsäure durchgemessen, die Bestimmung der adsorbierten Mengen nach der Tropfenzahl wird aber in diesem Falle schon recht ungenau. Die Adsorptionskurven sind auch in diesem Falle vom Typus der Kurven der Abb. 5. Im Mittel aus fünf Versuchen fanden wir die Heptylsäuremenge, die aus einer halbgesättigten Lösung adsorbiert wurde, zu 0,0047 Molen pro Mol AgJ, während sich für die Menge, die aus einer halbgesättigten Caprylsäurelösung adsorbiert wurde, aus sieben Versuchen ein Durchschnittswert gleich 0,0054 Molen pro Mol AgJ ergab.

2. Bestimmung der Adsorption in Gegenwart eines $AgNO_3$- oder KJ-Überschusses.

Diese erfolgte genau wie oben angegeben, nur enthielten die Lösungen, mit denen der Niederschlag gesättigt und ausgewaschen wurde, noch $AgNO_3$ bzw. KJ, und zwar in einer n/100 Konzentration; das Aufsuchen des Minimums fiel dabei selbstverständlich weg. Diese Bestimmungen schlossen sich denen der maximalen adsorbierten Menge an; die Resultate fünf solcher Versuche sind auf der rechten Seite der Abb. 5 aufgezeichnet. In den Versuchen 2, 3 und 4 enthielt die Lösung einen $AgNO_3$-Überschuß, in den Versuchen 5 und 6 einen KJ-Überschuß.

Berechnung der Kapazität der Doppelschicht.

Wir haben weiterhin versucht, die Kurven der Abb. 5 zu einer quantitativen Auswertung der Kapazität der Doppelschicht der AgJ-Oberfläche nach Gleichung (1) auszunutzen. Die Rechnung wurde wie folgt ausgeführt. Aus unseren Kurven kann man berechnen, in welchem Verhältnis man die Konzentration der aktiven Substanz vergrößern muß um beim Übergang von den optimalen Bedingungen zu einem $AgNO_3$- oder KJ-Überschuß die adsorbierte Menge konstant zu erhalten. Nehmen wir beispielsweise Versuch 5. Eine 0,002 Mol betragende adsorbierte Menge wird bei optimalen Adsorptionsbedingungen aus einer 0,00180 n Caprylsäurelösung adsorbiert, in Gegenwart von n/100 KJ aber aus einer 0,00316 n. Das Verhältnis 0,00316 : 0,00180, das wir mit k bezeichnen wollen, ist gleich 1,76. Würden wir die Berechnung für 0,0004, 0,001 und 0,004 Mol betragende

adsorbierte Mengen durchführen, so würden sich für k folgende Werte ergeben: 1,85, 1,71, 2,05 und im Durchschnitt für Versuch 5 $k = 1{,}85$. Eine ähnliche Rechnung ergibt für die Versuche 2, 3 und 4 $k = 2{,}34$, 2,20, 2,31 und für die Versuche 6 und 7 [letzterer ist in Abb. 5 nicht angeführt[1])] $k = 2{,}30$ und 2,38, im Durchschnitt für alle $AgNO_3$-Versuche $k = 2{,}28$, und für alle KJ-Versuche $k = 2{,}18$. Aus Gleichung (1) folgt nun

$$C - C' = \frac{2\,RT}{0{,}434\,S\,(\varphi_1 - \varphi_{\max.})^2}\lg k_1 \quad (2)$$

und

$$C - C' = \frac{2\,RT}{0{,}434\,S\,(\varphi_2 - \varphi_{\max.})^2}\lg k_2 \quad (3)$$

wenn man mit φ_1 und φ_2 die zu k_1 und k_2 zugehörigen k-Werte bezeichnet. Die φ-Werte in den Gleichungen (2) und (3) beziehen sich auf die P.-D. Lösung/AgJ, ihre Differenzen können aber nach dem, was wir oben gesagt haben, durch die Differenzen der Potentiale, die eine Silberelektrode in den entsprechenden Lösungen annimmt, ersetzt werden. Diese Potentiale haben, gegen eine Normalkalomelelektrode gemessen, folgende Werte: für n/100 $AgNO_3$ 0,40, für n/100 KJ — 0,275 und für die den optimalen Adsorptionsbedingungen entsprechende Ag-Ionenkonzentration 0,16 Volt; also $\varphi_1 - \varphi_{\max.} = -0{,}24$ Volt und $\varphi_2 - \varphi_{\max.} = 0{,}435$ Volt. Die Größe $\frac{RT}{S}$ kann man unter der Annahme berechnen, daß die Moleküle der Fettsäure in der Trennungsfläche Lösung/AgJ ebensoviel Platz einnehmen, wie in der Trennungsfläche Luft/Lösung. Für diesen Fall folgt aus Oberflächenspannungsmessungen $\frac{RT}{0{,}434\,S} = 30{,}0$ erg/qcm bei 18°[2]). Setzt man diese Werte in Gleichung (2) und (3), so bekommt man aus Gleichung (2)

$$C - C' = 37 \text{ mF/qcm}$$

und aus Gleichung (3)

$$C - C' = 11 \text{ mF/qcm}.$$

Wir wissen aus dem Gange der Elektrokapillarkurven der höheren Alkohole und Fettsäuren, daß die Größe C' klein gegen C ist; so berechnet sich für den Fall der Adsorption von tertiärem Amylalkohol an der Trennungsfläche Hg/Lösung $C' = 4{,}4$ mF/qcm[3]). Führt man

[1]) In den Versuchen 2, 3, 4 und 7 konnte die Rechnung nur für 0,0004, 0,001 und 0,002 Mole betragende adsorbierte Mengen durchgeführt werden.

[2]) Siehe z. B. *Frumkin*, l. c., auch für die Adsorption von Capronsäuremolekülen an einer Hg-Oberfläche, wie aus den anfangs erwähnten Messungen von Frl. *Kulwarskaja* folgt, gilt der hier angegebene RT/S-Wert.

[3]) *Frumkin*, Zeitschr. f. Phys. **35**, 798, 1926.

die Berechnung der Größe $C - C'$ für den Fall der Adsorption von Capronsäure an einer Hg-Oberfläche nach der hier beschriebenen Methode durch, so bekommt man $C - C' = 26$ mF/qcm, während nach *Krüger*[1]) der Mittelwert von C für Hg in einer normalen KNO_3-Lösung gleich 27 mF/qcm ist. Wir können also in erster Annäherung, da es sich doch um eine ganz rohe Schätzung handelt, C' gegen C vernachlässigen und die angegebenen Werte als ein Maß der Kapazität der Doppelschicht an der AgJ-Oberfläche in 0,25 n KNO_3 betrachten. Die berechneten C-Werte können allerdings keine hohen Ansprüche auf Genauigkeit erheben insbesondere da die Ableitung der Gleichung (1) die Unabhängigkeit der Größe C von φ voraussetzt, während in unserem Falle sich C mit φ stark ändert, wie dieses schon aus der Verschiedenheit der Resultate der Berechnung nach Gleichung (2) und (3) ersichtlich ist. Immerhin muß die Größenordnung der C-Werte doch richtig sein, und es ist bemerkenswert, wie nahe die von uns gefundenen Zahlen dem für die Kapazität der Hg-Oberfläche in einer normalen KNO_3-Lösung aus der Elektrokapillarkurve mit großer Genauigkeit berechneten Werte 27 mF/qcm kommen.

Andere Methoden zur Berechnung der Kapazität der Doppelschicht.

Führt man die potentiometrische Titration einer verdünnten $AgNO_3$-Lösung mit KJ einmal in Gegenwart einer größeren Menge (etwa 0,01 Mol pro 40 ccm Lösung) AgJ aus, ein anderes Mal aber, ohne überschüssiges AgJ in die Lösung einzuführen, so beobachtet man einen sehr verschiedenen Gang der Kurven der potentiometrischen Titration[2]).

Der Niederschlag übt in der Nähe des Äquivalenzpunktes eine Pufferwirkung aus, da zu dessen Umladung merkliche Mengen $AgNO_3$ bzw. KJ verbraucht werden. Diese sind wegen der Schwerlöslichkeit des Jodsilbers, solange wir uns von dem Äquivalenzpunkt um nicht mehr als 0,2 Volt entfernen, viel größer als die Mengen, die zur Fällung der J'- bzw. $Ag^{\cdot}$-Ionen der Lösung verbraucht werden. Die Pufferwirkung wird abgeschwächt, wenn der Niederschlag eine kapillaraktive Substanz adsorbiert; sorgt man durch Zugabe von überschüssiger organischer Säure dafür, daß der Niederschlag von ihr umhüllt wird, so verschwindet die Pufferwirkung, wie wir feststellen konnten, vollkommen. Aus der Größe der Pufferwirkung läßt sich die Gesamtladung

---

[1]) Zeitschr. f. Elektrochem. **19**, 620, 1913.

[2]) Dieses Verfahren ist eine Modifikation des von *Fajans* und *Frankenburger*, l. c., verwendeten. Auf den Einfluß des Niederschlags auf den Gang der potentiometrischen Titration hat auch *Kolthoff* (Maßanalyse **1**, 158, 1927) hingewiesen.



des festen Ag J leicht berechnen; wäre die Größe der adsorbierenden Oberfläche bekannt, so könnte man mit Leichtigkeit daraus auch die Ladungsdichte und die Kapazität der Doppelschicht finden. Die Abschätzung der Größe der Oberfläche der festen Phase kann nach drei Methoden ausgeführt werden.

1. Durch Abzählung der Teilchen unter dem Ultramikroskop, wenn sie sich noch in kolloider Lösung befinden; das ist der Weg, den *Fajans* und *Frankenburger* eingeschlagen haben.

2. Durch Bestimmung der maximal adsorbierten Menge eines kapillaraktiven Stoffes, welches einen gut ausgeprägten Grenzwert der Adsorption zeigt[1]).

3. Durch Bestimmung des bei der Adsorption einer gewissen Menge einer organischen Substanz bedeckten Bruchteils der Oberfläche aus der Verminderung der Größe der Pufferwirkung.

Wir hoffen bald über die Resultate von Versuchen, die nach 3. angestellt sind, berichten zu können, und werden dann auf den Vergleich der nach den verschiedenen Methoden berechneten Ladungsdichten näher eingehen.

Zusammenfassung.

Es wurde die Abhängigkeit der von einem Ag J-Niederschlag adsorbierten Menge Caprylsäure von der durch den Ag-Ionengehalt der Lösung bestimmten Potentialdifferenz Lösung/Jodsilber untersucht und gezeigt, daß das Adsorptionsvermögen des Jodsilbers für Caprylsäure bei einer bestimmten $Ag^{\cdot}$-Ionenkonzentration einen Maximumwert erreicht. Das dieser $Ag^{\cdot}$-Ionenkonzentration entsprechende Potential einer Silberelektrode, gegen eine Normalkalomelelektrode gemessen, ist gleich 0,16 Volt. Eine theoretische Deutung dieser Erscheinungen wurde gegeben und aus den bei verschiedenen Bedingungen aufgenommenen Adsorptionskurven die Kapazität der Doppelschicht an der Ag J-Oberfläche bestimmt.

[1]) *Paneth* und *Radu*, Ber. 57, 1221, 1924.

Über die Wirkung von äußeren Reizen auf den Brechungsindex des Blutserums.

Von

S. Balachowsky und W. Turbaba.

(Aus dem Biochemischen Institut des Kommissariats für Volksgesundheit in Moskau.)

(Eingegangen am 21. Januar 1927.)

Mit 3 Abbildungen im Text.

Im Jahre 1925 hat der eine von uns[1]) nachgewiesen, daß sich die Senkungsgeschwindigkeit der Erythrocyten nach der Nahrungsaufnahme überaus rasch verändert und daß diese Veränderungen reflektorischer Art sind.

Vorliegende Arbeit wurde mit der Absicht vorgenommen, zu ermitteln, ob schmerzhafte Reize auf das Blutserum einen Einfluß ausüben. Zum Studium der Wirkung schmerzhafter Reize wählten wir als kennzeichnendes Merkmal den Brechungsindex des Serums, der mittels des Eintauchrefraktometers von *Pulfrich-Zeiss* gemessen wurde.

Wurde aus ein und derselben Wunde eine Reihe von Blutproben entnommen (etwa alle 2 bis 4 Minuten), so ergab sich sowohl am Menschen wie am Kaninchen, daß schmerzhafte Traumen (ziemlich tiefer Einschnitt in die Fingerbeere, Einschnitt in die Ohrarterie des Kaninchens) gewöhnlich von sprunghaften Schwankungen des Brechungsindex des Serums begleitet werden. Gewöhnlich sind diese Sprünge erheblicher als die unter Ausschluß von schmerzhafter Reizung zur Beobachtung gelangenden Schwankungen.

Aus den Kurven 1 und 2 ist ersichtlich, daß beim Menschen die Reaktion auf Schnittwunde in einer Abnahme des Brechungsindex bestand, die sehr rasch erfolgte, aber keine besonders hohen Grade erreichte (in 2 Minuten Abnahme um 0,00045, nach weiteren 2 Minuten keine Schwankungen ähnlicher Größe).

[1]) „Presse Médicale", 13. Mai 1925.

Es sei darauf hingewiesen, daß beide Versuchspersonen sich während der ganzen Dauer des Versuchs in völliger Ruhe und Unbeweglichkeit befanden. Kurve 3 entspricht einem Versuch, in dem statt der Schnittwunde zweimal tiefe und dabei schmerzhafte (besonders das zweitemal) Einstiche in die Fingerbeere ausgeführt wurden. Hier wurde durch den schmerzhaften Reiz jedesmal ein Anstieg der Kurve hervorgerufen.

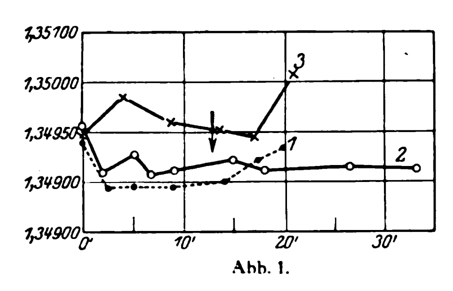


Abb. 1.

Die Kaninchenversuche ergaben, daß der Einschnitt in die Ohrarterie bedeutende Schwankungen des Brechungsindex zur Folge haben kann. Als Beispiel eines solchen Versuchs möge die Kurve 4 dienen. Zwischen der dritten und vierten Messung (um die vierte Minute) erfolgte eine Abnahme des Brechungsindex um 0,00098, zwischen der vierten und fünften Messung (um die fünfte Minute) Anstieg auf 0,00105. Ein weiterer Schmerzreiz um die 60. Minute nach Anfang des Versuchs bewirkte eine relativ anhaltende Senkung der Kurve. Die zweite Schnittwunde um die 41. Minute blieb ohne sichtbare Wirkung. Unser Versuchsmaterial umfaßt noch einige ähnliche Experimente, in denen die Wirkung des ersten Einschnitts und der schmerzhaften Reizung ebenso deutlich hervortreten.

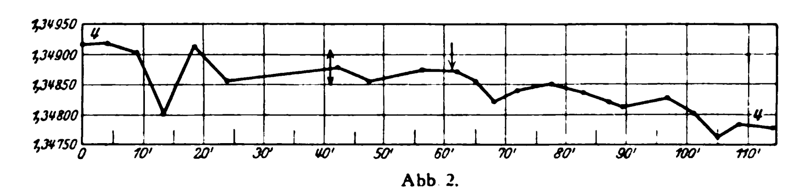


Abb. 2.

Es wurden weiter mehrere Versuche mit abgeänderter Methodik an Hunden ausgeführt. Bei diesen Tieren wurde das Rückenmark durchschnitten, wodurch die Sensibilität der hinteren Körperhälfte aufgehoben wurde. In der anästhetischen Körperhälfte wurde eine der Beinarterien bloßgelegt. Aus dieser Arterie wurden serienweise Blutproben entnommen und alsdann die schmerzhafte Reizung ausgeführt an verschiedenen Stellen der sensibeln Körperhälfte. Kurven 5 und 6 beweisen, daß schmerzhafte Reize (Kneifen mit der Zange)

den Verlauf der Kurven auf merkliche Weise beeinflussen, indem sie Ausschläge des Brechungsindex hervorrufen, die bis zu 0,00081 in 2 Minuten betragen. Kurve 7 gibt das Beispiel eines Versuchs mit negativem Resultat, der aber in jener Hinsicht von Interesse ist, daß der Schmerzreiz heftige Bewegungen des Tieres zur Folge hatte, was jedoch ohne jeglichen Einfluß auf den Verlauf der Kurve blieb.

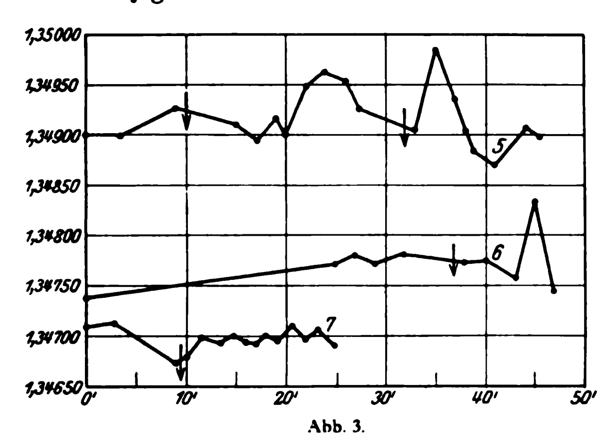


Abb. 3.

Dieser Versuch ist auch deshalb interessant, weil hier der Schmerzreiz mit einer spontanen Schwankung des Brechungsindex zusammentraf. Es drängt sich die Frage auf, ob es sich in diesem Falle nicht um die bekannte Erscheinung der Reflexhemmung durch äußere oder innere Nervenimpulse handelt.

Auf welche Weise ist der Einfluß der örtlichen schmerzhaften Reizung und des Traumas auf die Gesamtmasse des Blutes zu deuten? Ohne auf das Studium des Mechanismus dieser Erscheinung näher einzugehen, möchten wir darauf hinweisen, daß der heutige Stand unserer Kenntnisse die Beeinflussung der Gesamtmasse des Blutes durch örtliche schmerzhafte Reizung wohl kaum auf andere Weise erklären läßt, als durch die Beteiligung neutraler Reflexbogen.

Über die Zusammensetzung des Kammerwassers.

Von

T. Ikebata.

(Aus der chemischen Abteilung des Rudolf Virchow-Krankenhauses in Berlin.)

(Eingegangen am 23. Januar 1927.)

Mit 1 Abbildung im Text.

Die früher von *Leber* und seiner Schule vertretene Anschauung, nach der das Kammerwasser auf dem Wege der Filtration aus dem Blute in die Vorderkammer gelangt und durch den *Schlemm*schen Kanal abfließt, darf heute wohl als nicht mehr zu Recht bestehend angesehen werden.

Vielmehr ist man auf Grund der Untersuchungen von *Hamburger*, *Weiss*, *Magitot* und *Mestrezat*, *Lehmann* und *Meesmann*[1]) berechtigt anzunehmen, daß es molekulare Kräfte sind, die für einen ständigen Stoffaustausch zwischen Blut und Kammerwasser sorgen. Wäre das Kammerwasser ein einfaches Filtrat, so müßte man in ihm Kristalloide in demselben Mengenverhältnis finden wie im Blute. Für das Kochsalz aber ist von verschiedenen Autoren übereinstimmend erwiesen, daß es sich im Kammerwasser stets in größerer Menge findet als im Blute. Diese merkwürdige Tatsache wird von *Lehmann* und *Meesmann* damit erklärt, daß zwischen Blut und Kammerwasser ein Donnangleichgewicht besteht. Dieser Gleichgewichtszustand ist nach *Freundlich*[2]) dadurch charakterisiert, daß die Konzentration jedes einzelnen positiven Ions auf der Kolloidseite (Plasma) sich zu der des gleichen Ions auf der kolloidfreien Seite (Kammerwasser) gerade so verhält, wie die Konzentration jedes einzelnen negativen Ions auf der kolloidfreien Seite (Kammerwasser) zur Konzentration des betreffenden Ions auf der Kolloidseite (Plasma). — Diese Gesetzmäßigkeit ist bisher jedoch nur für das Kochsalz erwiesen, nicht dagegen auch für ein anderes Kristalloid, die Milchsäure, von der neuerdings *Wittgenstein* und *Gaedertz*[3]) festgestellt haben, daß auch sie im Kammerwasser sich in größerer Menge findet als im Plasma. Welche Erklärung aber auch später hierfür gegeben werden mag, fest steht jedenfalls, daß die Mengen von Kristalloiden im Kammerwasser abhängig sind von denen im Blute,

---

[1]) *G. Lehmann* und *A. Meesmann*, Pflügers Arch. **205**, 210, 1924; daselbst auch einschlägige Literatur.

[2]) *H. Freundlich*, Kapillarchemie. S. 759. Leipzig 1922.

[3]) *A. Wittgenstein* und *A. Gaedertz*, diese Zeitschr. **176**, 1, 1926.

und daß Verschiebungen im Blute auch im Kammerwasser in entsprechender Weise zum Ausdruck kommen. Besonders ist das von *Ask*[1]), *de Haen* und *van Creveld*[2]) gezeigt worden an dem Verhalten zwischen Blutzucker und Zucker im Humoraquaeus. Auch für die Milchsäure haben sich solche Beziehungen ergeben (*Wittgenstein* und *Gaedertz*).

Auf Veranlassung von Herrn Prof. *Wohlgemuth* habe ich nun versucht festzustellen, ob auch Verschiebungen von kolloiden Substanzen im Blute zu entsprechenden Änderungen im Kammerwasser führen. Dabei war ich mir klar, daß bei dem trägen Stoffaustausch im Kammerwasser eine kurze, schnell vorübergehende Konzentrationsänderung im Blute keineswegs eine entsprechende Änderung im Kammerwasser zu bedingen brauchte, daß also die Versuchsbedingungen so gewählt werden mußten, daß eine möglichst mehrere Tage anhaltende Änderung der Blutzusammensetzung gewährleistet war.

Von kolloiden Substanzen im Blute kamen in Betracht das Bluteiweiß und die Fermente.

Für die Anreicherung dieser Kolloide im Blute eines Tieres haben wir ein bequemes Mittel in der Unterbindung des Pankreasganges. Wenn man einem Kaninchen den Ductus Wirsungianus unterbindet und so dafür sorgt, daß das ganze Pankreassekret statt in den Darm sich in das Blut ergießt, so hat das, wie *Wohlgemuth*[3]) festgestellt hat, zur Folge, daß das Blut überschwemmt wird mit großen Mengen von Fibrinogen und diastatischem Ferment, und daß der Blutzucker beträchtlich ansteigt. Dabei ergeben sich für alle drei Bestandteile fast parallel verlaufende Kurven. Als erstes beobachtet man einen Anstieg des diastatischen Ferments im Blute, der bereits 5 bis 6 Stunden nach der Unterbindung einsetzt, nach 24 Stunden ist der Blutzucker erhöht und bisweilen auch schon das Fibrinogen.

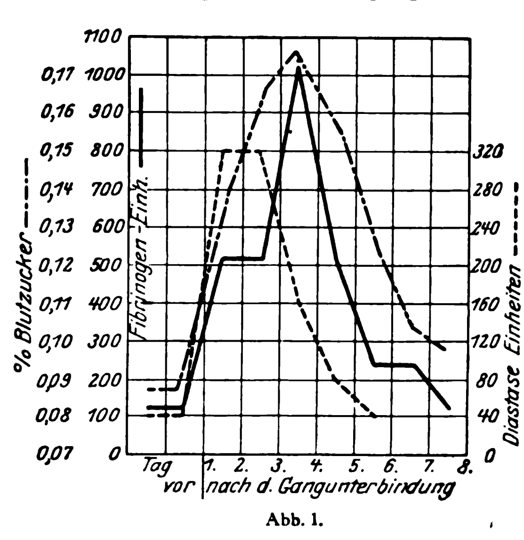


Abb. 1.

[1]) *F. Ask*, diese Zeitschr. **59**, 1, 1914.
[2]) *J. de Haen* und *S. van Creveld*, ebendaselbst **123**, 190, 1921.
[3]) *J. Wohlgemuth*, Berlin. klin. Wochenschr. 1917, Nr. 4.

Dieser Zustand dauert so lange an, als noch Pankreassekret ins Blut übertritt; sobald aber die Sekretion in der Drüse versiegt, sinkt auch wieder der Diastase-, der Blutzucker- und der Fibrinogenspiegel. (Siehe Abb. 1.)

Es war nun von Interesse zu verfolgen, ob im Kammerwasser die Konzentrationsverhältnisse der Kolloide sich nach der Unterbindung des Pankreasganges in dem gleichen Sinne verschieben wie im Blut.

I.

Zunächst prüfte ich *das Verhalten des diastatischen Ferments.*

Daß im Kammerwasser sich Diastase findet, ist bereits von *Leber* festgestellt worden. Doch war bisher über die quantitativen Verhältnisse nichts bekannt. Ich ermittelte an meinen Tieren den Diastasegehalt des Kammerwassers mit der von *Wohlgemuth* angegebenen Methode und stellte fest, daß er, entsprechend dem geringen Gehalt des Kammerwassers an Kolloiden, im Verhältnis zu den Quantitäten im Blute außerordentlich gering ist.

Ich ging in meinen Versuchen so vor, daß ich bei drei Kaninchen zunächst mehrere Tage vor der Unterbindung zu verschiedenen Zeiten die Diastase im Kammerwasser und im Blute der Tiere bestimmte und dann nach Unterbindung fast täglich den Verlauf der Diastaseschwankungen verfolgte. Alles weitere ist aus den Protokollen ersichtlich.

	Versuch I Diastase im		Versuch II Diastase im		Versuch III Diastase im	
	Blut $d^{38^0}_{24h}$	Kammerwasser $d^{38^0}_{24h}$	Blut $d^{38^0}_{24h}$	Kammerwasser $d^{38^0}_{24h}$	Blut $d^{38^0}_{24h}$	Kammerwasser $d^{38^0}_{24h}$
Vorperiode	512	6,6	512	54	512	6,6
	1024	13	1024	27	512	11
Nach der Unterbindung						
1. Tag	4096	—	8190	54	1024	27
2. „	—	25	—	27	2048	62
3. „	—	27	2048	125	2048	13
4. „	1024	52	1024	54	1024	8
5. „	512	26	1024	13	512	11
6. „	512	6,6	512	26	512	11
7. „	512	6,6	512	13	—	—

Zunächst geht aus der Tabelle hervor, daß die Diastase im Kammerwasser bei ein und demselben Tiere in der Norm keine großen Schwankungen zeigt; dagegen differieren die Werte einzelner Tiere untereinander sehr stark. So enthält das Kammerwasser von Tier 2 etwa vier- bis fünfmal so viel Diastase wie das von Tier 1 und 3. Verglichen mit dem Blute, ist das Kammerwasser sehr arm an Diastase.

Während die Unterbindung des Pankreasganges in Versuch 1 und 2 innerhalb 24 Stunden zu maximaler Steigerung der Blutdiastase führt, im Falle 3 erst innerhalb 48 Stunden, folgt der Anstieg im Kammerwasser nur sehr langsam. Im Versuch 1 macht sich zwar schon am zweiten Tage eine Steigerung bemerkbar, sie erreicht aber ihren Höhepunkt erst am vierten Tage, als schon die Blutdiastase wieder fast zur Norm zurückgekehrt ist, und zeigt am sechsten Tage wieder ihren Ausgangswert. Im Versuch 2 sehen wir erst am dritten Tage nach der Unterbindung ein Ansteigen der Diastase im Kammerwasser, also auch zu einer Zeit, wo die Diastase des Blutes sich dem Normalwert wieder genähert hat. Nur im Versuch 3 steigt die Diastase im Kammerwasser bereits nach 24 Stunden an, erreicht zusammen mit der Blutdiastase am zweiten Tage ihren Höhepunkt und sinkt am dritten Tage wieder ab.

Die Versuche haben somit übereinstimmend ergeben, daß für den Fermentgehalt im Kammerwasser maßgebend ist der Fermentgehalt im Blute. Steigt er im Blute an, so beobachtet man auch im Kammerwasser eine Zunahme, geht er im Blute zurück, so folgt auch das Kammerwasser mit einer Abnahme. Es liegen also die Verhältnisse für Kolloide im Kammerwasser ganz ähnlich wie für Kristalloide, nur mit dem Unterschied, daß der Austausch von Kristalloiden sich ausgiebiger und schneller vollzieht als der des Kolloids.

Ein ganz ähnliches Verhalten wie das Kammerwasser zeigt die Cerebrospinalflüssigkeit. Für sie haben *Wohlgemuth* und *Szésci*[1]) gezeigt, daß sie normaliter nur ganz geringe Mengen an Diastase enthält, daß nach Unterbindung des Pankreasganges die Diastase im Liquor beträchtlich ansteigt und nach Absinken der Diastase im Blute auch aus der Cerebrospinalflüssigkeit bis auf geringe Spuren verschwindet.

II.

Sodann bemühte ich mich, etwaige *Verschiebungen in der Eiweißzusammensetzung des Kammerwassers* unter dem Einfluß der Gangunterbindung festzustellen. Bei den sehr geringen Eiweißmengen im Kammerwasser war es natürlich unmöglich, Albumin und Globulin voneinander zu trennen und jedes für sich gesondert zu bestimmen. Hier konnte die Entscheidung nur mit einer Methodik getroffen werden, die gestattete, in so kleinen Flüssigkeitsmengen, wie sie aus der vorderen Augenkammer des Kaninchens erhältlich sind, ohne besondere Vorbehandlung eine Verschiebung des Quotienten $\frac{\text{Albumin}}{\text{Globulin}}$ zu erkennen.

[1]) *J. Wohlgemuth* und *St. Szécsi*, Zeitschr. f. d. ges. Neurologie u. Psychiatrie **13**, 455, 1912.

Eine solche besitzen wir neuerdings in der von *Rosenfeld*[1]) in unserem Laboratorium ausgearbeiteten Nachtblaureaktion. Sie ist von ihm gedacht für die Untersuchung der Cerebrospinalflüssigkeit auf das Vorkommen pathologischer Albuminmengen und beruht im Prinzip darauf, daß das Nachtblau, ein elektropositiv geladener kolloidaler Farbstoff bei einer bestimmten Wasserstoffionenkonzentration mit dem negativ geladenen Albumin ausflockt. *Rosenfeld* ging von der Überlegung aus, daß, da der isoelektrische Punkt des Albumins bei $p_H = 4{,}7$, der des Globulins bei $p_H = 5{,}4$ liegt, bei einer in der Mitte zwischen diesen beiden Werten gelegenen Wasserstoffionenkonzentration, also bei $p_H = 5{,}0$, die Albumine negativ, die Globuline elektropositiv geladen sein müssen. Da sich nun bekanntlich entgegengesetzt geladene Kolloide gegenseitig ausflocken, so war die Möglichkeit gegeben, bei dieser $H^{\cdot}$-Konzentration das negative Albumin durch ein eiweißempfindliches, positiv geladenes Sol auszuflocken und so in einem geeigneten Medium gelöstes Albumin und Globulin zu diffenrenzieren. Das gelang in der Tat sehr gut, und *Rosenfeld* hat am Liquor einwandfrei gezeigt, daß es mit Hilfe des Nachtblaus möglicht ist, Verschiebungen im Albumingehalt mit Sicherheit festzustellen.

Das Sol, das man hierzu benötigt, setzt sich zusammen aus einer 0,1proz. wässerigen Lösung von Nachtblau (*Grübler*) — das *Merck*sche Nachtblau löst sich nicht in Wasser — und einem Puffergemisch, bestehend aus 110 ccm n/10 Essigsäure + 90 ccm n/10 Natriumacetat + 200 ccm Aqua dest. (doppelt destilliert). Die $H^{\cdot}$-Konzentration dieses Puffers beträgt 4,7. Man verdünnt nun die Nachtblaulösung auf das Zehnfache mit bestem destillierten Wasser und versetzt gleiche Teile dieser Farbstoffverdünnung mit gleichen Teilen Pufferlösung. Dieses Reagens hat dann eine $H^{\cdot}$-Konzentration von $p_H = 5{,}0$.

Analog der Vorschrift für Liquor wurde so vorgegangen, daß zunächst einmal ermittelt wurde, welche kleinste Menge Kammerwasser noch ausreicht, um mit der Farbstofflösung eine Trübung zu geben. Wir sahen eine solche noch auftreten bei Anwendung von 0,2 ccm normalen Kammerwassers; 0,1 ccm ließ keine Trübung mehr erkennen. Der Versuch wurde stets so ausgeführt, daß 0,2 ccm Kammerwasser in einem Reagenzglas mit doppelt destilliertem Wasser auf 1,0 ccm aufgefüllt und mit 2,0 ccm des frisch hergestellten Farbstoffreagens versetzt wurde. Zur Kontrolle wurde ein anderes Reagenzglas von derselben Weite mit 1,0 ccm Wasser + 2,0 ccm Reagens beschickt und nach 5 Minuten langem Stehen beide Gläser miteinander verglichen. Wenn eine Trübung im ersten Gläschen eintrat, so hatte sie ihr Maximum spätestens nach 5 Minuten, meistens noch früher erreicht.

[1]) *H. Rosenfeld*, Klin. Wochenschr. 1927, Nr. 3; diese Zeitschr. **167**, 343, 1926.

Nach der Unterbindung prüfte ich fast täglich in derselben Weise das Kammerwasser und stellte fest, daß in den beiden ersten Tagen, bisweilen auch am dritten Tage, noch 0,2 ccm Kammerwasser mit dem Reagens eine Trübung gaben, am vierten Tage waren schon 0,3 ccm erforderlich und am fünften und sechsten Tage 0,4 ccm; am siebenten und achten Tage genügten dann wieder 0,2 ccm für den positiven Ausfall der Reaktion.

Dieser Befund besagt, daß infolge der Unterbindung entweder das Albumin im Kammerwasser abgenommen oder das Globulin zugenommen hat oder, was dasselbe ist, der Quotient $\frac{\text{Albumin}}{\text{Globulin}}$ sich zugunsten des Globulins verschoben hat. Nun haben wir eingangs gesehen, daß die Unterbindung des Pankreasganges beim Kaninchen eine Überschwemmung des Blutes mit Fibrinogen zur Folge hat, die etwa 4 bis 5 Tage anhält (s. Kurve Abb. 1). Das Fibrinogen ist aber ein Globulin. Die Unterbindung des Ductus Wirsungianus führt somit zu einer Globulinvermehrung im Plasma. Die Folge davon ist, daß auch im Kammerwasser der Globulingehalt vorübergehend zunimmt. Beim Absinken des Fibrinogens treten dann schließlich wieder dieselben Verhältnisse ein wie vor der Unterbindung.

Es hat sich also gezeigt, daß auch die qualitative Zusammensetzung des Eiweißes im Kammerwasser abhängig ist von der qualitativen Zusammensetzung des Eiweißes im Blute.

III.

Als weitere Folge der Unterbindung des Pankreasganges beim Kaninchen kennen wir den Anstieg des Blutzuckers, der mehrere Tage anhält und meistens nach 4 bis 5 Tagen wieder fast zur Norm zurückkehrt (s. Kurve S. 237). Wenn man so vorbehandelte Tiere noch weiter beobachtet, so findet man, daß nach 1 oder 2 Wochen der Blutzucker wieder zu steigen beginnt und schließlich eine Höhe zeigt, wie wenn das Tier einen Diabetes hätte, ohne daß dabei Zucker im Harn aufzutreten braucht. Dieser Zustand ist, wie *Wohlgemuth*[1]) gezeigt hat, so zu erklären, daß bei den Tieren sich im Laufe der Zeit eine ausgesprochene Sympathicotonie entwickelt hat.

An solchen Tieren habe ich nun auch das *Verhalten des Zuckers im Kammerwasser* studiert. Wie schon eingangs erwähnt, bestehen über die Beziehungen zwischen Glucose im Blute und im Kammerwasser bereits eingehende Untersuchungen von *Ask* und von

[1]) *Wohlgemuth* und *Mochizuki*, Klin. Wochenschr. 1924, Nr. 29, S. 1320; diese Zeitschr. **150**, 123, 1924; *Wohlgemuth* und *Seo*, Klin. Wochenschr. 1925, Nr. 30; diese Zeitschr. **163**, 271, 1925.



de Haen und *van Creveld*. Ich beschränkte mich deshalb darauf, die Schwankungen der experimentell hervorgerufenen Blutzuckerverschiebungen im Kammerwasser bei drei Tieren zu verfolgen, und teile das Resultat in folgender Tabelle mit; die Zuckerbestimmungen wurden nach *Hagedorn* und *Jensen* ausgeführt; die mitgeteilten Zahlen sind Mittelwerte aus gut übereinstimmenden Doppelanalysen.

	Versuch I Proz. Glucose im		Versuch II Proz. Glucose im		Versuch III Proz. Glucose im	
	Blut	Kammerwasser	Blut	Kammerwasser	Blut	Kammerwasser
Vor der Unterbindung	0,101	0,127	0,117	0,120	0,113	0,119
Nach der Unterbindung						
1. Tag	0,145	0,166	0,091	0,119	0,093	0,115
2. „	—	0,162	0,091	0,118	0,107	0,113
3. „	0,164	0,163	0,109	0,124	0,109	0,122
4. „	0,202	0,175	0,087	0,120	0,114	0,123
5. „	0,169	0,160	0,088	0,128	0,105	0,131
6. „	0,182	0,205	0,149	0,198	0,113	0,149
7. „	0,126	0,154	0,170	0,225	0,117	0,130
8. „	0,113	0,137	0,151	0,224	0,106	0,133
9. „	0,117	0,127	0,161	0,191	0,100	0,126
10. „	0,108	0,135	0,180	0,225	0,105	0,147
19. „	0,134	0,139 [0,095]	0,266	0,318 [0,200]	0,213	0,289 [0,158]

In Versuch 1 tritt unmittelbar nach der Unterbindung eine Blutzuckersteigerung ein, die erst am achten Tage wieder verschwindet. Am 19. Tage sehen wir wieder ein Ansteigen des Blutzuckers; offenbar befindet sich das Tier in diesem Zeitpunkt im Beginn der Sympathicotonie. Beim zweiten Tiere beginnt die Blutzuckersteigerung erst am sechsten Tage, hält mehrere Tage an, und am 19. Tage ist das Tier bereits stark sympathicotonisch. Beim dritten Tiere machte die Unterbindung des Ductus Wirsungianus wegen seiner abnormen Lage Schwierigkeiten; beim Absuchen des Darms war er gerissen und konnte nicht mehr mit Sicherheit identifiziert werden. Deshalb bleibt auch die anfängliche Blutzuckersteigerung aus, aber nach 19 Tagen hat sich dennoch eine ausgesprochene Sympathicotonie entwickelt.

Wir sehen nun in allen Fällen zunächst einmal, daß die Zuckermenge im Kammerwasser immer höher ist als im Blute. Das beruht darauf, daß die korpuskulären Elemente des Blutes, die bei der Bestimmung mit gemessen werden, wenig oder fast gar keine Glucose enthalten. Sodann sehen wir stets ein Ansteigen des Zuckers im Kammerwasser, wenn der Blutzucker ansteigt. Doch verlaufen die Zahlen keineswegs parallel; denn manchmal beträgt die Differenz 20 Proz.; bisweilen sogar 40 Proz. und noch mehr. Das ist einmal begründet durch die Schwankungen in den Blutkörperchenmengen, dann aber

auch vielleicht durch Schwankungen in dem Gehalt des Blutes an gebundenem Zucker. Darauf möchten wir auch das Zurückbleiben der Zuckerwerte im Kammerwasser hinter dem Blutzucker am dritten, vierten und fünften Tage im Versuch 1 zurückführen.

Zu unserer Orientierung bestimmten wir noch bei unseren drei Tieren den Zuckergehalt der Glaskörperflüssigkeit, die wir uns durch Punktieren mit einer dicken Kanüle verschafften. Die Werte finden sich in obiger Tabelle am Tage der Entnahme in Klammern [ ] angegeben. Es zeigte sich in allen Fällen, daß die Zuckermengen im Glaskörper hinter denen im Kammerwasser wesentlich zurückbleiben, ja weit unter den Werten im Gesamtblut liegen.

IV.

Schließlich interessierte noch das Vorkommen von anderen Fermenten neben der Diastase im Kammerwasser.

Zunächst gelang mir ganz leicht der *Nachweis eines fettspaltenden Ferments* mit Hilfe der Tributyrinmethode. Doch war seine Wirkung meist sehr schwach. Allerdings müssen wir zugeben, daß uns für diese Versuche nur sehr geringe Mengen Kammerwasser zur Verfügung standen. Die Versuche mußten in der Mehrzahl der Fälle mit nur 0,3 ccm, bisweilen noch darunter, ausgeführt werden; ganz selten standen uns 0,4 ccm zur Verfügung. Das Resultat war meist eine Spaltung von nur 25 bis 30 Proz. Tributyrin bei einer Versuchsdauer von 2 Stunden. Wir beobachteten aber, daß, wenn wir bei demselben Tiere sehr bald ein zweites Mal Kammerwasser entnahmen, dann mehr Lipase anzutreffen war als in der ersten Portion. Offenbar hängt das mit dem stärkeren Übertritt von Kolloiden aus dem Blute in das Kammerwasser zusammen.

Ich untersuchte dann auch auf *peptolytisches Ferment*, und zwar auf Glycyltryptophan spaltendes. Ein solches findet sich im Blute in großer Menge, auch im Pankreassaft ist es reichlich vorhanden und ebenso in verschiedenen Organen. Die Versuche wurden so ausgeführt, daß das zu untersuchende Kammerwasser versetzt wurde mit etwa 0,02 g Glycyl-tryptophan, gelöst in 1,0 ccm physiologischer NaCl-Lösung, und unter Toluol in den Brutschrank gestellt wurde. Nach 24 Stunden wurde mit Hilfe der Bromreaktion auf Freiwerden des Tryptophans geprüft. Im Kammerwasser des normalen Tieres gelang mir der Nachweis dieses Ferments nicht; dagegen konnte ich in zwei Fällen nach Gangunterbindung eine deutlich positive Tryptophanreaktion feststellen. Offenbar waren mit dem Pankreassaft große Mengen des Ferments ins Blut gelangt und ebenso wie die Diastase ins Kammerwasser übergetreten.

Endlich bemühte ich mich, noch ein *glykolytisches Ferment* im Kammerwasser nachzuweisen. *Wittgenstein* und *Gaedertz* hatten beobachtet, daß, wenn sie frisch entnommenes Kammerwasser bei Zimmertemperatur stehen ließen, die Menge der in ihm enthaltenen Milchsäure zunahm, und führten dies auf die Gegenwart von Glykolyse zurück. Ich wollte nun am Zucker des Kammerwassers die Stärke der Glykolyse messen, kam aber stets zu negativen Resultaten, selbst wenn ich die Versuche über 3 Stunden ausdehnte, natürlich unter Beobachtung streng aseptischer Kautelen. Als Beleg mögen zwei Versuche mitgeteilt werden.

	Versuch I Proz. Glucose	Versuch II Proz. Glucose
Anfangswert	0,137	0,298
Nach 1 Std. bei 38° . .	0,137	0,297
„ 2 „ „ 38 . .	0,138	0,297
„ 3 „ „ 38 . .	0,139	0,297

Im ersten Versuch kam ein Kammerwassergemisch von drei normalen Tieren, im zweiten Versuch ein solches von drei sympathicotonischen zur Verwendung. Ich habe somit im Kammerwasser des Kaninchens kein glykolytisches Ferment nachweisen können.

Zusammenfassung.

1. Der Gehalt des Kammerwassers an diastatischem Ferment ist sehr gering. Schwankungen des Diastasegehalts des Blutes spiegeln sich auch im Kammerwasser wieder.

2. Verschiebungen im Verhältnis von Albumin zu Globulin im Blute machen sich auch im Kammerwasser bemerkbar.

3. Der Zuckerspiegel im Kammerwasser folgt den Schwankungen des Blutzuckerspiegels.

4. Außer der Diastase findet sich im Kammerwasser des Kaninchens eine Lipase und unter besonderen Bedingungen ein peptolytisches Ferment.

Über symmetrische und asymmetrische Spaltung von racemischem Tyrosin durch Hefegärung und über ihre Beeinflußbarkeit durch vitaminartig wirkende Nährsubstrate.

Von

Felix Ehrlich.

(Aus dem Institut für Biochemie und landwirtschaftliche Technologie der Universität Breslau.)

(Eingegangen am 1. Februar 1927.)

In einer Reihe früherer Arbeiten[1]) habe ich zeigen können, daß gärende Hefe die Racemverbindungen natürlich vorkommender und auch anderer α-Aminosäuren derartig vollständig asymmetrisch zu spalten vermag, daß man sich eines auf diesem Prinzip aufgebauten Verfahrens mit Vorteil zur präparativen Reindarstellung der einen optisch-aktiven Komponente vieler Aminosäuren bedienen kann. Diese einfache und bequem zu handhabende biologische Spaltungsmethode[2]), die heute bereits vielfach in der biochemischen Praxis eingeführt ist, beruht im wesentlichen auf einer sehr schnell verlaufenden partiellen Vergärung der racemischen Aminosäuren mit einem Überschuß von lebender Hefe bei Gegenwart von viel Zucker ohne die Notwendigkeit der Anwendung sonstiger Nährsalze. Es gelang auf diese Weise verhältnismäßig leicht, aus den Racemverbindungen die optischen Antipoden der im Eiweiß vorkommenden Aminosäuren rein zu gewinnen, und zwar wurden diese bisher erhalten von Alanin, Serin, Valin, Leucin, Isoleucin, Glutaminsäure, Phenylalanin und Histidin. Auch andere racemische Aminosäuren, wie das Isovalin und das Phenylglykokoll, und ein racemisches Dipeptid, das Alanyl-Glycin, konnten durch Hefegärung optisch aktiviert werden. Bei allen diesen Versuchen zeigte es sich, daß zunächst immer das natürlich auftretende Stereoisomere der racemischen Aminosäuren vorwiegend von der Hefe vergoren

---

[1]) *F. Ehrlich*, diese Zeitschr. 1, 8, 1906; 8, 438, 1908; **63**, 379, 1914.
[2]) Derselbe, Abderhaldens Handb. d. biol. Arbeitsmethoden.

wurde, daß sich aber der Angriff der Hefe stets auch auf den optischen Antipoden der betreffenden Aminosäure erstreckte. Doch war bei der Vergärung der beiden stereomeren Komponenten der genannten racemischen Aminosäuren der Unterschied in der Angriffsgeschwindigkeit der Hefe in allen Fällen so groß, daß die in der Natur *nicht* vorkommende Komponente zumeist zu 60 bis 70 Proz. der theoretisch möglichen Ausbeute in optischer Reinheit aus den vergorenen Lösungen gewonnen wurde.

Es war nun sehr bemerkenswert, daß im Gegensatz zu den erwähnten Aminosäuren die Racemverbindungen von *Asparaginsäure*, *Tyrosin* und *Prolin* durch Hefegärung stets nur *symmetrisch* angegriffen wurden. Selbst bei schonendster Verarbeitung der vergorenen Lösungen, die jede Wiederracemisierung ausschloß, ließen sich bei Vergärung dieser drei racemischen Aminosäuren immer nur inaktive Produkte zurückgewinnen oder bei Anwendung eines Überschusses von Hefe und Zucker verschwanden beide optisch-aktiven Komponenten von racemischem Tyrosin und Asparaginsäure sogar vollkommen aus dem Gärgut, was bis dahin noch bei keiner Aminosäure beobachtet war. Diese Unterschiede im Verhalten der einzelnen Racemverbindungen gegen Hefe mußten um so auffälliger erscheinen, als doch gerade die der Asparaginsäure und dem Tyrosin chemisch nahe verwandten Aminosäuren Glutaminsäure und Phenylalanin durch Hefegärung sehr leicht und in guter Ausbeute asymmetrisch gespalten werden.

Bis dahin waren nur sehr wenige Fälle von symmetrisch verlaufenden biochemischen Prozessen beim Abbau derselben drei racemischen Aminosäuren bekannt. So greift die Tyrosinase[1]) die beiden Stereoisomeren des Tyrosins gleichmäßig schnell an, und das bei der Fleischfäulnis wirkende Bakteriengemisch vermag racemische Asparaginsäure, doch ebensogut auch racemische Glutaminsäure nur in symmetrischem Sinne zu zersetzen[2]). Aber eine derartig weitgehende Differenzierung vereinzelter Racemverbindungen natürlich vorkommender Aminosäuren bei der Assimilation durch ein und denselben Organismus wie im vorliegenden Falle war bisher nicht beobachtet worden.

Eine Erklärung für diese eigentümlich abgestufte Wirkungsweise der Hefe schien zunächst in der Richtung zu liegen, daß die Hefe aus dem Grunde keinen Unterschied bei der Verarbeitung der beiden Stereoisomeren der Asparaginsäure, des Tyrosins und des Prolins macht, weil es sich sowohl bei der d- wie bei der l-Komponente dieser Aminosäuren um ein dem Organismus natürlich angepaßtes Substrat handelt. Wenigstens ließen manche Literaturangaben darauf schließen,

[1]) *G. Bertrand* und *Rosenblatt*, C. r. **146**, 304, 1908.
[2]) *C. Neuberg*, diese Zeitschr. **18**, 431, 1909.

daß gerade die genannten drei Aminosäuren im Gegensatz zu vielen anderen in pflanzlichen und tierischen Stoffen sich in beiden optischen Modifikationen vorfinden, wodurch auch die Fähigkeit des Hefeorganismus beide Raumformen vollwertig als natürliche Stickstoffnahrung auszunutzen erklärlich erschien. Hiermit im Widerspruch stand allerdings schon die frühere Beobachtung von *J. Wohlgemuth*[1]), der bei Verfütterung von dl-Tyrosin und dl-Asparaginsäure an Kaninchen aus dem Harn d-Tyrosin und d-Asparaginsäure isolieren konnte. Noch schwieriger aber wird eine Erklärung der differenten Wirkungsweise der Hefe, nachdem später *M. Tsudji*[2]) gezeigt hat, daß im Gegensatz zur symmetrischen Spaltung bei der Hefegärung die Spaltung von dl-Tyrosin durch die Bakterien Proteus vulgaris und Subtilis asymmetrisch erfolgt und daß man hierbei optisch reines d-Tyrosin gewinnen kann.

In den letzten Jahren habe ich dann mit mehreren Mitarbeitern meine Untersuchungen von neuem aufgenommen und in verschiedenster Richtung fortgesetzt. Dabei ergab sich *das sehr merkwürdige Resultat*, daß *auch Hefe zu einer asymmetrischen Spaltung von racemischem Tyrosin befähigt ist und d-Tyrosin in optischer Reinheit und guter Ausbeute liefert, wenn den gärenden Lösungen nur geringe Mengen pflanzlicher Nährsubstrate zugesetzt werden.*

Diese Beobachtungen wurden gelegentlich einiger Kulturversuche gemacht, bei denen verschiedene Heferassen auf Lösungen von *dl-Tyrosin* gezüchtet wurden. Wie ich schon vor längerer Zeit gezeigt habe[3]), wachsen auf Lösungen von Zucker und natürlichem *l-Tyrosin*, die nebenbei nur anorganische Nährsalze (Dikaliumphosphat, Magnesiumsulfat, Spuren von Chlornatrium und Eisensalzen) enthalten, eingeimpfte Hefezellen recht günstig, wobei mehr oder minder lebhafte Gärung und starke Zellvermehrung auftritt und aus den vergorenen Lösungen nach beendetem Wachstum der Hefe stets als normales Eiweißstoffwechselprodukt, aus dem Tyrosin herstammend, *Tyrosol* (p-Oxyphenyläthylalkohol) zu isolieren ist. Ersetzt man in diesen Versuchen unter sonst gleichen Bedingungen und Konzentrationsverhältnissen das l-Tyrosin durch das *dl-Tyrosin*, so kommt man auch hier zu analogen Resultaten, indem eine geringe Zellaussaat meist zur Bildung nicht unbeträchtlicher Hefetrockensubstanz und zur Entstehung von Tyrosol führt in Mengen, die denen des aus dem Gärgut verschwundenen Tyrosins ungefähr entsprechen. Untersucht man nun aber das aus den vergorenen Lösungen zurückgewonnene, von der

[1]) Ber. 38, 2064, 1905.
[2]) *M. Tsudji*, Act. Schol. Med. 1, 439, 1917.
[3]) *F. Ehrlich*, Ber. 44, 139, 1911.

Hefe unverbrauchte Tyrosin, so erweist es sich stets als *optisch-inaktiv*, gleichgültig, welche Heferasse in Anwendung gekommen ist, ob Brennerei-, Bier- oder Weinhefe. Also auch bei diesen von wenigen Hefezellen ausgehenden Kulturversuchen findet stets eine symmetrische Spaltung des dl-Tyrosins statt, genau so wie bei der Vergärung mit einem großen Überschuß von Zucker und fertiggebildeter Hefe. Zu denselben Resultaten gelangt man, wenn die Wasserstoffionenkonzentration der Nährlösungen durch verschiedene Phosphatzusätze geändert wird. Innerhalb des Bereichs von $p_H = 7{,}6$ bis 5,0, wobei noch ein günstiges Wachstum der Hefe zu erzielen ist, traten wohl geringe Schwankungen in der Ausbeute an Hefetrockensubstanz und Tyrosol ein, das unverbrauchte Tyrosin war indes in allen Fällen stets optisch-inaktiv.

Ein völlig anderes Bild ergaben nun aber die Versuche, wenn den Hefezellen, die in dl-Tyrosinlösungen häufig nur langsam und scheinbar unterernährt heranwuchsen, zur Förderung des Wachstums noch *andere natürliche Nährsubstrate aus Pflanzenextrakten* dargeboten wurden. *Schon sehr geringe Zusätze von Auszügen aus Malz oder aus Malzkeimen oder von Hefeautolysat* zu den Lösungen, die sonst nur dl-Tyrosin, Zucker und anorganische Nährsalze enthielten, bewirkten eine viel schneller einsetzende und bedeutend intensiver verlaufende Vermehrung und Gärung der eingeimpften Hefezellen. Die Nährlösungen trübten sich gewöhnlich sehr bald und gaben auch in viel kürzerer Zeit nach lebhafter Gasentwicklung, schon äußerlich erkennbar, einen wesentlich stärkeren Bodensatz von Hefe als in den Versuchen ohne die genannten Zusätze. Die gewöhnlich nach etwa 3 bis 4 Wochen abgebrochenen Versuche ließen mikroskopisch meist reichliche Verbände reiner, gut genährter Hefezellen erkennen, während in den Parallelversuchen ohne Zusatz vielfach stark granulierte und kümmerlich gewachsene Zellen zu beobachten waren, die auf eine Art Hungerzustand der Hefe schließen ließen. Diesen äußeren Befunden entsprechend zeigte sich auch bei Aufarbeitung der vergorenen Lösungen, daß in den Versuchen, bei denen die genannten Nährwürzen hinzugefügt waren, *sehr viel mehr Zucker und Tyrosin von der Hefe umgesetzt* und in annähernd gleichem Grade *beträchtlich mehr Tyrosol* und *ganz bedeutend mehr Hefetrockensubstanz* selbst entstanden war, deren Menge auf das Vielfache, häufig sogar *auf mehr als das Fünf- bis Zehnfache* anstieg gegenüber den Versuchen ohne solche Zusätze. Von größtem Interesse war es nun aber, daß das unverbrauchte, aus den Lösungen nach der Hefezüchtung in viel geringeren Mengen zu isolierende *Tyrosin* bei diesen Ernährungsversuchen *fast stets optisch aktiv war und deutlich rechts drehte*, und daß in vielen Fällen auf diese Weise *d-Tyrosin in optischer Reinheit* gewonnen werden konnte. Es ist besonders be-

achtenswert, daß, um diesen eigenartigen Effekt hervorzurufen, schon äußerst geringe Zusätze der betreffenden Nährextrakte genügen im Vergleich zu den Mengenverhältnissen der übrigen Komponenten der angewandten Nährlösungen. Am günstigsten erwies sich bisher die Wirkung von *Hefeautolysat* und *Malzkeimauszug*, von denen bereits *Trockensubstanzmengen von nur 2 bis 5 Proz. des Gewichts des vorgelegten dl-Tyrosins* ausreichend sind, um die Hefe zur asymmetrischen Spaltung dieser Aminosäure zu veranlassen. Für die Aufzucht kamen bei diesen Versuchen hauptsächlich zur Anwendung die obergärige Preßhefe Rasse XII, daneben eine Hefe aus einer Melassebrennerei, sowie eine obergärige Brauereihefe. Doch scheinen auch andere Heferassen unter den gleichen Bedingungen eine ähnliche optisch-aktivierende Wirkung auf dl-Tyrosin zu besitzen. Dagegen versagten manche Heferassen, wie Rasse II, vollkommen, indem sie nur inaktives Tyrosin zurücklieferten, und auch die frisch bezogene, meist am besten wirkende Rasse XII, schien in einigen Fällen bei wiederholter Umzüchtung im Laboratorium aus noch nicht aufgeklärten Gründen ihre Fähigkeit, racemisches Tyrosin asymmetrisch zu spalten, allmählich zu verlieren.

Es erhob sich nun die Frage, ob man nicht, ähnlich wie in den hier erwähnten Versuchen, das früher von mir beschriebene Verfahren zur asymmetrischen Spaltung von racemischen Aminosäuren durch Vergärung mit einem Überschuß von Zucker und Hefe auch für dl-Tyrosin anwendbar machen kann, indem man gleichartige Zusätze von Nährwürzen dem Gärgut zufügt. Tatsächlich ist dies der Fall, wie Untersuchungen mit zwei Preßhefen des Handels von verschiedener Herkunft zeigten. Die *Vergärung von dl-Tyrosin mit viel Zucker und Hefe unter Zugabe von geringen Mengen Hefeautolysat* vollzog sich glatt in 2 Tagen und lieferte bei der Verarbeitung der vergorenen Lösungen auch hier annähernd *optisch reines d-Tyrosin in Ausbeuten bis zu 60 Proz. der Theorie*, während aus einer ebenso zusammengesetzten Lösung *ohne Hefeautolysat*, die mit derselben Hefe vergoren war, sich *nur optisch-inaktives Tyrosin* zurückgewinnen ließ. Als biologische Darstellungsmethode wird also künftig auch für das d-Tyrosin das schnell verlaufende Hefegärverfahren zu bevorzugen sein, da sich die mit dem Bacillus proteus erst in 40 Tagen zu erzielende Spaltung des racemischen Tyrosins wesentlich schwieriger und umständlicher gestaltet[1]).

Eine nähere Erklärung für die hier beobachtete eigentümlich differenzierte Wirkungsweise der Hefe zu geben, ist zunächst schwierig. Offenbar handelt es sich dabei um Vorgänge, die im engsten Zusammenhang mit dem Wachstum, dem Aufbau der Leibessubstanz und mit dem Eiweißstoffwechsel der Hefe stehen. Scheinbar sind in den *Malz-*

[1]) *M. Tsudji*, a. a. O.



und Hefeextrakten gewisse lebenswichtige, den Vitaminen ähnliche Stoffe vorhanden, die *für den normalen Stoffwechsel der Hefe unentbehrlich sind* und bei deren Gegenwart, selbst wenn sie nur in geringsten Mengen vorhanden, die Assimilation des Tyrosins durch die Hefe und sein Umsatz sich wesentlich günstiger vollziehen, so daß unter diesen, den natürlichen besser angepaßten Bedingungen die Auswahl der beiden Komponenten des racemischen Tyrosins durch die Hefe vorwiegend spezifisch erfolgt und das hauptsächlich in der Natur vorkommende l-Tyrosin in erster Linie angegriffen wird. Daß schon *minimale Dosen von Hefe- und Malzauszug*, deren geringer Nährstoffgehalt an sich die Mehrproduktion an Hefe in den Versuchen unmöglich hervorgerufen haben kann, die *asymmetrische Spaltung von verhältnismäßig so großen Mengen dl-Tyrosin* in so typischer Weise beeinflussen, macht es sehr wahrscheinlich, daß hier *vitaminartige Substanzen oder Ergänzungsnährstoffe* im Spiele sind. Dafür scheint auch zu sprechen, daß die *alkohollöslichen Anteile der wirksamen Malzauszüge und Hefeautolysate in kleinsten Quantitäten* den Nährlösungen zugesetzt, *die Hefe* ebenso zur *Bildung von d-Tyrosin* veranlassen, während die mit Alkohol aus den Malz- und Hefeextrakten ausgefällten Stoffe nur wenig optisch aktivierend wirken.

Wie ich früher[1]) zeigen konnte, spaltet gärende und wachsende Hefe die Aminosäuren des Nährbodens in einen stickstofffreien Komplex (Fuselöl, Bernsteinsäure, Tyrosol usw.) und in Kohlendioxyd und Ammoniak zufolge der allgemeinen Gleichung:

$$R.CH(NH_2).CO_2H + H_2O = R.CH_2OH + CO_2 + NH_3.$$

Von dem großen Molekül der Aminosäuren wird für den eigentlichen Eiweißaufbau ihrer Leibessubstanz von der Hefe nur das Ammoniak verwertet, alle übrigen abfallenden Spaltkörper werden als unbrauchbar für den Stoffwechsel von den Zellen nach außen in die Nährlösung wieder ausgeschieden. Aus dem abgespaltenen Ammoniak, dem Zucker und den Salzen der Nährlösung bildet sich die Hefe ihr Plasmaeiweiß. Demnach vollzieht sich also auch in einem Nährmedium, das nur dl-Tyrosin, Zucker und die üblichen anorganischen Nährsalze enthält, die Eiweißassimilation der Hefe nicht anders als wenn den Hefezellen nur Zucker und Ammoniak neben Mineralsalzen dargeboten werden. Nun wissen wir aus den Untersuchungen von *Pasteur* und *Duclaux*, daß anorganischer Stickstoff in Form von Ammoniak zur Ernährung und Bildung der Hefe ausreichend ist. Aber bei Aussaat von nur wenigen Zellen auf solchen anorganischen Nährsalzlösungen wachsen die Kulturhefen doch nur recht schwierig heran und ent-

[1]) *F. Ehrlich*, Ber. **40**, 1027, 1907; diese Zeitschr. **36**, **477**, **1911**.

wickeln sich wenig günstig, da ihnen offenbar noch gewisse lebenswichtige Stoffe für die Ernährung fehlen, die in den natürlichen Substraten, besonders in den Nährwürzen der Brennereien und Brauereien, reichlich vorhanden sind. Die von mir an verschiedenen Heferassen gemachten Beobachtungen über ihre Ernährung mit dl-Tyrosin, Zucker und Mineralsalzen ohne und mit Zusatz von pflanzlichen Nährextrakten erinnern in ihrer Auswirkung und in ihren Resultaten in vieler Hinsicht an die bekannten Biosversuche von *Wildiers*[1]). Er zeigte, daß, wenn eine zuckerhaltige Nährlösung den Stickstoff ausschließlich in Form von Ammoniak enthielt, weder Gärungserscheinungen noch Wachstum der Kulturhefen eintraten, falls nur eine geringe Anzahl von Hefezellen eingeimpft wurde. Erst nach Zusatz von Hefeextrakt, Pepton oder Würze wurde eine Vermehrung der Hefe erzielt, woraus *Wildiers* schloß, daß zum Wachstum der Hefe anorganischer Stickstoff nicht ausreicht, sondern daß noch eine organische, alkohollösliche Substanz unbekannter Art, von ihm Bios genannt, notwendig sei. Diese Substanz sei zwar in der Hefe enthalten, könne aber von der Hefe nicht in solcher Menge neugebildet werden, daß sie zur Vermehrung genügt. Wenn auch die Untersuchungen und die Resultate von *Wildiers* vielfach angezweifelt worden sind, so enthalten sie doch, auf den heutigen Stand der Ernährungslehre bezogen, in ihrem Kern insofern etwas Richtiges, als auch die Hefe, ebenso wie die höheren Organismen, für eine normale Ernährung und Fortpflanzung gewisse vitaminartige Stoffe, wie sie sich eben nur in natürlichen Substraten finden, in ihrer Nahrung nicht entbehren kann. Hierfür sind die folgenden Wachstumsversuche mit Kulturhefen ein neuer Beleg. Offenbar befinden sich Hefezellen, die nur auf Lösungen von Tyrosin, Zucker und Mineralsalzen gesetzt sind, wenn sie auch darauf langsam wachsen, in einer Art Hungerzustand vergleichbar dem, wie er eintritt, wenn höhere Organismen eine vitaminfreie oder -arme Nahrung, nur bestehend aus Eiweiß, Fetten, Kohlehydraten und Salzen, erhalten. Es erscheint wohl möglich, daß solche hungernden Hefezellen auf dl-Tyrosin wahllos beide optischen Stereoisomeren der racemischen Aminosäure assimilieren und verarbeiten, so daß nur optisch-inaktives Tyrosin aus der vergorenen Lösung zurückgewonnen werden kann oder dieses ganz verschwindet. Dagegen wird durch Zugabe der Nährwürzen zu den dl-Tyrosin-, Zucker-, Salzlösungen durch die zugeführten Vitamine ein den natürlichen Bedingungen angepaßtes Milieu geschaffen, das zu einem normalen, üppigen Wachstum der

[1]) *Wildiers*, La Cellule **18**, 313, 1901; *A. Kossowicz*, Zeitschr. f. landw. Vers. Wes. Öst. **6**, 106, 731, 1903; *H. Pringsheim*, Centralbl. f. Bakteriol. II, **16**, 111, 1906; vgl. auch *H. Euler* und *P. Lindner*, Chemie der Hefe, S. 228 bis 230. Leipzig 1915.



Hefe führt und diese befähigt, in spezifischer Weise selektiv das natürlich vorkommende l-Tyrosin bei der Assimilation zu bevorzugen und den optischen Antipoden zum größten Teil unangegriffen zu lassen. Ein der Aussaat von wenigen Hefezellen ähnlicher, anormaler Zustand tritt scheinbar ein, wenn man Lösungen von dl-Tyrosin und Zucker mit einem Überschuß von Preßhefe vergärt. In diesem Falle handelt es sich um stickstoffarme, nach dem Lüftungsverfahren herangezüchtete Hefezellen, die sich auch in einem gewissen Hungerstadium befinden. Durch die Versuchsanordnung sind diese Hefezellen gezwungen, aus dem Stickstoff des Tyrosins und dem Zucker Eiweiß zu bilden, wobei ihnen aber die zu einer normalen Entwicklung nötigen Salze und Vitamine fehlen, die sie sich in der kurzen Zeit der Gärung nicht aus ihrer eigenen Leibessubstanz beschaffen können. Daher auch hier gewissermaßen ein anormaler Hungerstoffwechsel, der zum gleichmäßigen, wahllosen Abbau beider Raumformen des racemischen Tyrosins führt. Wird dagegen von vornherein zu den Lösungen von dl-Tyrosin und Zucker ein Extrakt von autolysierten Hefezellen zugesetzt, der, aus viel Hefe bereitet, alle lebenswichtigen Ergänzungsnährstoffe reichlich enthält, so vollzieht sich wieder eine der natürlichen adäquate Plasmabildung, was zur Folge hat, daß die Hefezellen vorzugsweise die natürlich vorkommende Komponente des dl-Tyrosins assimilieren und viel d-Tyrosin bei Beendigung der Gärung zurücklassen.

Was die Natur der hier vermuteten vitaminartigen Stoffe anlangt, welche die N-Assimilation der Hefe richtend beeinflussen, so läßt sich hierüber nur wenig aussagen. Sie scheinen alkohollöslich zu sein und relativ hitzebeständig, da die benutzten Malz- und Hefeextrakte zur Sterilisierung gewöhnlich mehrmals zuvor im Dampftopf erhitzt waren.

Naturgemäß umfaßt der Erklärungsversuch der hier beobachteten Erscheinungen nicht alle Seiten des Problems und ist noch in mehrfacher Hinsicht unvollkommen [1]). Es bleibt zunächst ganz unverständlich, warum die Hefe die Racemverbindungen der übrigen Aminosäuren, die oben aufgezählt sind, direkt ohne Zusatz von Nährwürzen asymmetrisch spaltet und warum nur Tyrosin, Asparaginsäure und Prolin davon eine Ausnahme bilden. Über das Verhalten der Racemformen der letzteren beiden Aminosäuren und über die Spaltung durch verschiedene andere Heferassen wird später berichtet werden.

Kultur- und Gärversuche in der hier gegebenen Anordnung werden jedenfalls noch über manche andere wichtige, Wachstum,

---

[1]) Hier wären unter anderem besonders auch die bedeutsamen Arbeiten über die Biochemie des Asymmetrieproblems von *C. Neuberg*, diese Zeitschr. **51**, 506, 1913, von *P. Mayer*, diese Zeitschr. **174**, 420, 1926, sowie *C. Neuberg* und *E. Simon*, diese Zeitschrift **179**, 443, 1926, zu berücksichtigen.

Eiweißstoffwechsel und Vitamingehalt der Hefe und anderer Organismen betreffende Fragen Aufschluß gewähren können.

Nachfolgend seien die Resultate einiger charakteristischer Versuche der Vergärung von dl-Tyrosin mittels Hefe ohne und mit Zusatz von Nährwürzen mitgeteilt.

Experimenteller Teil.

Nach Versuchen von *Adolf Hackbarth*[1]) und *Ida Bender*.

Versuchsreihe I.

Aufzucht der obergärigen Heferasse XII in Lösungen von dl-Tyrosin bei verschiedener H-Ionenkonzentration.

In drei Glaskolben von je 2 Liter Inhalt wurde einzeln eine Nährlösung eingefüllt, in jedem Falle bestehend aus *1 g dl-Tyrosin*, 25 g Rohrzucker (Raffinade), 0,1 g $MgSO_4 + 7 H_2O$, Spuren NaCl und $FeCl_3$ in 1 Liter destillierten Wassers. Es wurden ferner wechselnde Mengen Phosphate aufgelöst, und zwar bei

Versuch 1 . . . 1 g K_2HPO_4
„ 2 . . . 0,5 g K_2HPO_4 + 0,5 g KH_2PO_4
„ 3 . . . 1 g KH_2PO_4

Nach Verschluß der Kolben mit Wattebäuschen wurden die einzelnen Flüssigkeiten je eine Viertelstunde auf dem Baboblech aufgekocht. Nach dem Abkühlen untersuchte man die Lösungen auf p_H und erhitzte sie dann nochmals zur Sterilisierung. Nunmehr erfolgte die Beimpfung der Nährlösungen mit je einer Platinöse einer frischen, auf Bierwürzagar üppig gewachsenen Kultur von Heferasse XII. Es wurde darauf besonders geachtet, daß der Abstrich jedesmal möglichst gleichmäßig von einer dicken Schicht Hefezellen geschah, ohne daß Teile des Nährmediums mitgerissen wurden. Die beimpften Nährlösungen wurden bei 25° C aufbewahrt und nach einigen Tagen täglich einmal gleichmäßig geschüttelt. Nach vierwöchigem Wachstum wurde die in jedem Versuch entstandene Hefe, die sich mikroskopisch als rein erwies, auf ein gewogenes dichtes Filter abfiltriert, mit Wasser gut gewaschen und nach dem Trocknen bei 110° zur Wägung gebracht. Das ursprüngliche Filtrat der Hefe wurde auf seine Acidität durch Titration mit n/10 NaOH gegen Phenolphthalein, ferner auf seine Reduktion gegen *Fehling*sche Lösung und auf seine Polarisation im 2-dm-Rohr untersucht. Aus dem Filtrat und den gesammelten Waschwässern erhielt man durch Eindampfen zu einem kleinen Volumen in jedem Falle das gesamte unverbrauchte Tyrosin zunächst in roher, noch gefärbter Form zurück. Es wurde scharf abgesaugt, mit kaltem Wasser, Alkohol und Äther wiederholt gewaschen und bei 110° getrocknet. Nach dem Umlösen aus heißem Wasser unter Zusatz von Tierkohle und Kieselgur gewann man daraus reine Präparate, die in 4proz. Lösung in 21proz. Salzsäure auf ihre optische Drehung untersucht wurden. Die wässerigen und alkoholischen Filtrate wurden zusammen auf ein kleines Volumen verdampft,

[1]) Inaugural-Dissertation Breslau 1923.

mit Natriumbicarbonat schwach alkalisch gemacht und im Extraktionsapparat erschöpfend mit Äther ausgezogen. Der ätherische Extrakt wurde verdampft und die Menge des nach dem Reiben bald auskristallisierten Tyrosols bestimmt. Die angegebenen Zahlen beziehen sich auf die Rohausbeute.

Die erhaltenen Resultate der Untersuchungen sind nachstehend tabellarisch geordnet.

Versuch Nr.	p_H urspr.	Hefetrockensubstanz Ausbeute g	Vergorene Lösung: 10 ccm Filtrat verbr. ccm n/10 NaOH zur Neutralisation	Vergorene Lösung: Reduktion (*Fehling*)	Vergorene Lösung: Polarisation °Sacch. $l = 2$	Tyrosol g	Unverbrauchtes Tyrosin: roh g	Unverbrauchtes Tyrosin: rein $[\alpha]_D$
1	7,6	0,119	1,0	+	— 2,3	0,23	0,70	0°
2	6,8	0,105	1,2	+	— 2,4	0,14	0,66	0
3	5,0	0,078	1,25	+	— 3,6	0,15	0,74	0

Die einzelnen Versuche zeigen in ihren Ergebnissen untereinander keine großen Unterschiede. Hinsichtlich des Zuckerverbrauchs, der Hefe- und Tyrosolausbeute stellt sich der Versuch 1 mit Dikaliumphosphat am günstigsten, während in Versuch 3 mit Monokaliumphosphat deutlich weniger Zucker verbraucht und weniger Hefe entstanden ist. In allen drei Versuchen erweist sich das wiedergewonnene Tyrosin *als optisch inaktiv*.

Versuchsreihe II.

Kulturversuche mit Rasse XII in dl-Tyrosinlösung bei Gegenwart von Malzauszug.

Es wurden drei Nährlösungen folgender Zusammensetzung bereitet:

Lösung Nr. 1 enthielt auf 1 Liter Wasser *1 g dl-Tyrosin*, 25 g Rohrzucker, 1 g K_2HPO_4, 0,1 g $MgSO_4 + 7\,H_2O$, Spuren NaCl und $FeCl_3$, sowie *1 ccm* eines *Malzauszugs*.

Lösung Nr. 2 enthielt dieselben Substanzen wie Nr. 1, aber *5 ccm desselben Malzauszugs*.

Lösung Nr. 3 war *ebenso* zusammengesetzt wie Nr. 2, aber *unter Weglassung des Tyrosins*.

Der benutzte Malzauszug war aus Pilsener Malz der Breslauer Aktien-Malzfabrik wie folgt hergestellt:

200 g feingemahlenes Malzschrot wurden in 1000 ccm Wasser suspendiert im Wasserbad 2 Stunden auf 50 bis 55° gehalten. Hierauf wurde die Mischung 1 Stunde im Dampftopf erhitzt und dann durch Tücher und Faltenfilter klar filtriert. Der Malzauszug für die Gärversuche wurde in kleinen Mengen in Kölbchen durch je halbstündiges Erhitzen an drei aufeinanderfolgenden Tagen sterilisiert. Nach jedesmaligem Öffnen eines Kolbens zur Entnahme von Extrakt wurde der Rest eine halbe Stunde im Dampftopf erhitzt.

Der auch im folgenden benutzte Malzauszug spindelte 12° Balling bei 20° und zeigte $p_H = 5{,}4$. 5 ccm der Malzwürze enthielten 0,385 g Maltose. Der Trockensubstanzgehalt von 5 ccm Malzauszug betrug 0,6175 g, der Aschengehalt 0,0115 g.

Die ebenso wie früher sterilisierten und mit Rasse XII beimpften drei Nährlösungen wurden nach vierwöchiger Aufbewahrung bei 25° genau so wie in Versuchsreihe I aufgearbeitet.

Versuch Nr.	Zusatz zur Nährlösung	p_H urspr.	Hefe-ernte trocken g	Vergorene Lösung: 10 ccm Filter verbr. ccm n/10 NaOH	Vergorene Lösung: Reduktion	Vergorene Lösung: Polarisation °Sacch. $l = 2$	Tyrosol g	Unverbrauchtes Tyrosin: roh g	Unverbrauchtes Tyrosin: rein $[\alpha]_D^{20}$
1	1 g dl-Tyrosin usw. + 1 ccm Malzauszug	7,7	0,32	1,25	—	0	0,19	0,30	+ 8,5° (1 u. 2)
2	1 g dl-Tyrosin usw. + 5 ccm Malzauszug	7,7	0,58	1,2	—	0	0,51	0,15	
3	*ohne* dl-Tyrosin + 5 ccm Malzauszug	7,7	0,12	0,6	+	— 3,8	0		

Die Versuche 1 und 2 zeigten gegenüber den früheren ohne Zusätze ein sehr schnelles Angären, eine lebhafte CO_2-Entwicklung und ein üppiges Wachstum der Hefe, die sich als rein und gut ernährt erwies. Der Zucker war vollkommen aufgebraucht und die Hefeausbeuten auf das Drei- bis Fünffache gegenüber dem entsprechenden Versuch in Versuchsreihe I gesteigert. Dem stärkeren Abbau des Tyrosins entsprechend war auch der Ertrag an Tyrosol, besonders in Versuch 2, ein höherer. Daß dieses nicht aus den Substanzen des Malzauszugs stammen kann, beweist Versuch 3 ohne Tyrosin, wobei überhaupt kein Tyrosol auftrat, nur wenig Zucker verbraucht und wenig Hefe entstanden ist.

Das zurückgewonnene Tyrosin erweist sich im Gegensatz zu den Versuchen ohne Zusätze als *deutlich optisch-aktiv* und *rechtsdrehend*. Das in beiden Versuchen zusammen erhaltene rohe Tyrosin (0,45 g) wurde aus Wasser umkristallisiert und auf diese Weise im ganzen 0,24 g *optisch reines d-Tyrosin* erzielt.

0,24 g trockene Substanz in 6 ccm 21proz. Salzsäure gelöst[1]), zeigten im 0,5-dm-Rohr bei einer Konzentration von $c = 4$ eine Drehung von $\alpha_D^{20} = + 0{,}17°$. Dem entspricht eine spezifische Drehung von $[\alpha]_D^{20} = + 8{,}5°$.

E. Fischer[2]) fand die spezifische Drehung des aus einer Alkaloidspaltung der Benzoylverbindung gewonnenen d-Tyrosins *in einer 4,6 proz. Lösung in 21 proz. Salzsäure zu + 8,64°*.

Versuchsreihe III.

Kulturversuche mit Rasse XII in dl-Tyrosinlösung bei Zusatz der alkohollöslichen und alkoholunlöslichen Teile von Malzauszug.

Drei Nährlösungen, von denen wieder jede im Liter Wasser enthielt: *1 g dl-Tyrosin*, 25 g Rohrzucker, 1 g K_2HPO_4, 0,1 g $MgSO_4 + 7\,H_2O$,

---

[1]) Die leichte Löslichkeit der Substanz in 21 proz. HCl, in der dl-Tyrosin sehr schwer löslich ist, war in diesen und den später folgenden Versuchen stets bereits ein Anzeichen dafür, daß reines d-Tyrosin vorlag.

[2]) *E. Fischer*, Ber. **32**, 3645, 1899.

Spuren NaCl und $FeCl_3$, wurden in Versuch 1 mit 5 ccm Malzauszug, in Versuch 2 mit dem *alkohollöslichen Teil von 5 ccm Malzauszug* und in Versuch 3 mit dem *alkoholunlöslichen Teil von 5 ccm Malzauszug* versetzt, gleichmäßig sterilisiert, mit Rasse XII beimpft und 4 Wochen bei 25° zur Gärung angesetzt. Außerdem wurde noch ein Versuch mit 1 g dl-Tyrosin ohne Malz vorbereitet (Versuch 4).

Die Anteile des Malzauszugs waren in der Weise erhalten worden, daß 5 ccm davon mit 100 ccm 96proz. Alkohols gut durchgeschüttelt wurden, worauf man den Niederschlag filtrierte, den Rückstand wiederholt mit Alkohol auswusch, im Vakuum trocknete und ihn in Wasser gelöst der Lösung Nr. 3 zusetzte. Die alkoholischen Filtrate und Waschwasser wurden verdampft und nach Vertreiben des Alkohols der sirupöse Rückstand in Wasser gelöst der Lösung Nr. 2 zugefügt. In einem Parallelversuch wurde ermittelt, daß der alkohollösliche Teil von 5 ccm Malzauszug 0,3950 g trocken wog, also mehr als die Hälfte der Gesamttrockensubstanz ausmachte. Er enthielt 0,0037 g Asche, demnach ein Drittel der Gesamtasche.

Versuch Nr.	Zusätze zur Nährlösung	Hefeernte trocken g	Vergorene Lösung			Tyrosol g	Unverbrauchtes Tyrosin	
			10 ccm verbr. ccm n/10 NaOH	Reduktion	Polarisation °Sacch. $l = 2$		roh g	rein $[\alpha]_D^{20}$
1	1 g dl-Tyrosin usw. + 5 ccm Malzauszug	0,549	1,0	—	0	0,24	0,30	+ 8,52°
2	1 g dl-Tyrosin usw. + alkohollösl. Teil v. 5 ccm Malzauszug	0,544	1,1	—	0	0,25	0,27	
3	1 g dl-Tyrosin usw. + alkoholunlöslich. Teil von 5 ccm Malzauszug	0,203	1,1	+	— 3,4	0,12	0,57	+ 1,79
4	1 g dl-Tyrosin usw. *ohne* Malzauszug	0,040	0,6	+	— 4,1	0,10	0,80	0

In diesem Falle war die Hefe auf Tyrosin-Zucker-Salzlösung ohne weitere Zusätze besonders schlecht gewachsen (Versuch 4). Zucker und Tyrosin waren nur wenig angegriffen, das Tyrosin wieder symmetrisch. Dagegen zeigten die Versuche 1 und 2 mit Malzauszug fast ganz gleichmäßig ein sehr intensives Wachstum und lebhafte Gärung der Hefe sowie einen vollständigen Verbrauch des Zuckers und weitgehenden Abbau des Tyrosins. Die Tyrosol- und Tyrosinausbeuten sind ebenfalls dieselben. In den Alkohol, mit dem der Malzauszug extrahiert wurde, sind also scheinbar alle wachstumsfördernden Stoffe übergegangen, so daß der Alkoholextrakt genau die gleichen Wirkungen ausgeübt hat wie der Malzauszug, aus dem er hergestellt wurde. In beiden Versuchen ist optisch reines d-Tyrosin zurückgeblieben. Infolge der geringen Ausbeute im einzelnen Falle mußten die Präparate der beiden Versuche zusammen umkristallisiert und auf Drehung untersucht werden, die dadurch keine Depression erfuhr. Im Gegensatz hierzu war bei Versuch 3, in dem die alkohol*un*löslichen Teile des Malzauszugs zugesetzt waren, ein erheblich schlechteres Wachstum der Hefe erfolgt, der Zucker und das Tyrosin waren nur schlecht verwertet, die zurückbleibende Aminosäure zeigte eine viel niedrigere Drehung, was auf eine nur unvollkommene asymmetrische Spaltung schließen ließ.

Versuchsreihe IV.

Kulturversuche mit Rasse XII in dl-Tyrosinlösung unter Zusatz von Hefeautolysat.

Die in den vorigen Versuchen verwandte Standardlösung von 1 g dl-Tyrosin, Zucker und Mineralsalzen wurde in gleicher Konzentration pro Liter mit Zusätzen von steigenden Mengen Hefeautolysat versetzt (Versuche 1 bis 4). Außerdem wurden Gäransätze zum Vergleich mit denselben Mengen Hefeautolysat, Zucker und Salzen, aber ohne Tyrosin, (Versuche 5 bis 7) und ein Leerversuch (Versuch 8) nur mit Zucker und Mineralsalzen parallel zusammengestellt. Die Angärung erfolgte wieder, ausgehend von der gleichen Kultur der Rasse XII, bei 25°. Dauer der Versuche 4 Wochen.

Der Hefeauszug wurde durch Autolyse wie folgt bereitet: 500 g Preßhefe (frisch bezogen von der Breslauer Vertriebsstelle des Verbandes deutscher Preßhefefabrikanten) wurden direkt in einem Kolben im Wasserbad bei 50 bis 55° C zur Autolyse gebracht. Die nach etwa 12 Stunden völlig verflüssigte Hefe ergab, mit 500 ccm H_2O versetzt und eine halbe Stunde gekocht, einen Auszug, der klar filtriert und in üblicher Weise im Dampftopf sterilisiert wurde. Der Hefeauszug enthielt in 100 ccm 5,29 g Trockensubstanz und 0,26 g Asche.

Versuch Nr.	Zusätze zur Nährlösung	Hefeernte trocken g	Vergorene Lösung: 10 ccm verbr. ccm n/10 NaOH	Vergorene Lösung: Reduktion	Vergorene Lösung: Polarisation °Sacch. $l = 2$	Tyrosol g	Unverbrauchtes Tyrosin: roh g	Unverbrauchtes Tyrosin: rein $[\alpha]_D^{20}$
1	1 g dl-Tyrosin usw. *ohne* Hefeauszug	0,119	1,0	+	— 2,3	0,23	0,70	0°
2	1 g dl-Tyrosin usw. + 1 ccm Hefeauszug	0,495	0,8	—	0	0,18	0,30	
3	1 g dl-Tyrosin usw. + 5 ccm Hefeauszug	0,717	0,85	—	0	0,30	0,29	+ 8,54°
4	1 g dl-Tyrosin usw. + 10 ccm Hefeauszug	0,937	0,7	—	0	0,41	0,29	
5	1 ccm Hefeauszug usw. *ohne* Tyrosin	0,116	0,5	+	— 3,1			
6	5 ccm Hefeauszug usw. *ohne* Tyrosin	0,382	1,1	+	— 0,7			
7	10 ccm Hefeauszug usw. *ohne* Tyrosin	0,590	1,2	—	0	0,02		
8	Leerversuch mit Zucker und Salzen *ohne* Tyrosin *ohne* Hefeauszug	0,040*)	0,1	+	+ 1,4			

*) Der Bodensatz bestand aus mineralischen Niederschlägen neben vereinzelten abgestorbenen Hefezellen.

Der Ausfall der Versuche läßt die eigentümliche Fähigkeit des Hefeauszugs, das Wachstum der lebenden Hefezellen stark zu steigern und dabei ihre Assimilation des Tyrosins, und zwar gerade des l-Tyrosins, günstig zu beeinflussen, deutlich erkennen. Mit steigendem Zusatz von Hefeextrakt steigt auch die Hefeernte und die Tyrosolausbeute, wobei natürlich zu beachten ist, daß das Hefeautolysat auch ohne Tyrosin be-

trächtliche Mengen von Hefe liefert. Aber bei ihrem Abzug verbleibt gegenüber dem Versuch ohne Hefeautolysat immer noch eine drei- bis vierfache Steigerung der Hefeausbeute, die nur auf Kosten des stärker angegriffenen Tyrosins zu setzen ist. Daß das Mehr an Tyrosol bei steigendem Zusatz von Hefeextrakt nicht etwa aus diesem selbst entstanden sein kann, sondern nur aus dem zugefügten Tyrosin, zeigt der Vergleichsversuch 7 deutlich. Bemerkenswert ist auch, daß schon 1 ccm des Hefeauszugs, enthaltend 0,05 g Trockensubstanz, d. h. nur 5 Proz. vom angewandten dl-Tyrosin, genügt, um die Hefe zur totalen Vergärung des Zuckers und zur maximalen Assimilation und asymmetrischen Spaltung des racemischen Tyrosins zu veranlassen.

Zur Bestimmung der *spezifischen Drehung des unverbrauchten Tyrosins* wurden die in den Versuchen 2 bis 4 zurückerhaltenen Präparate zusammen verarbeitet. 0,89 g rohes Tyrosin gaben beim Umkristallisieren nach dem Trocknen bei 110° im ganzen 0,6965 g reines *d-Tyrosin*. Sie wurden in 17,0 ccm 21proz. HCl gelöst. $c = 4{,}1$, $l = 2$, $\alpha_D^{20} = +0{,}70^0$, folglich $[\alpha]_D^{20} = +8{,}54^0$.

Versuchsreihe V.

Kulturversuche mit Rasse XII in dl-Tyrosinlösung unter Zusatz der alkohollöslichen und alkoholunlöslichen Teile von Hefeautolysat.

Die Versuche wurden mit der Standardlösung von 1 g dl-Tyrosin usw. ähnlich wie die in Versuchsreihe III ausgeführt. Die Aufteilung des Hefeauszugs geschah wie beim Malzauszug in der Weise, daß 5 ccm des obigen Hefeextrakts mit 100 ccm 96proz. Alkohols geschüttelt, der alkoholunlösliche Teil abfiltriert und aus dem alkohollöslichen Teil der Alkohol verdampft wurde. Die beiden Rückstände löste man getrennt für sich mit Wasser auf und setzte sie zwei parallel angestellten Nährlösungen zu, die wieder mit Rasse XII beimpft und nach 4 Wochen untersucht wurden. Der alkohollösliche Teil von 5 ccm Hefeauszug enthielt 0,152 g Trockensubstanz.

Versuch Nr.	Zusätze zur Nährlösung	Hefeernte trocken g	Vergorene Lösung: 10 ccm verbr ccm n 10 NaOH	Vergorene Lösung: Reduktion	Vergorene Lösung: Polarisation °Sacch. $l = 2$	Tyrosol g	Unverbrauchtes Tyrosin: roh g	Unverbrauchtes Tyrosin: $[\alpha]_D^{20}$
1	1 g dl-Tyrosin usw. + Alkohollösliches von 5 ccm Hefeauszug	0,74	0,9	—	0	0,35	0,27	+8,88°
2	1 g dl-Tyrosin usw. + Alkoholunlöslich. v. 5 ccm Hefeauszug	0,52	1,1	—	0	0,33	0,40	+1,50

Wenn auch der Zucker in beiden Fällen gleichmäßig vergoren war, so ist auch hier der besonders günstige Einfluß der alkohollöslichen Stoffe des Hefeextrakts auf das Wachstum der Hefe und die Verwertung des Tyrosins bei der Assimilation gegenüber den in Alkohol nicht löslichen Teilen unverkennbar. In Versuch 1 ist fast genau so viel Hefe und Tyrosol gebildet und Tyrosin verbraucht worden, wie bei Verwendung der ursprünglichen 5 ccm des Hefeextrakts (Versuch 3 in Versuchsreihe IV) und ebenso

d-Tyrosin von optischer Reinheit zurückgeblieben, während im Parallelversuch vorwiegend dl-Tyrosin neben wenig d-Tyrosin erhalten wurde, wie aus der Drehung zu entnehmen ist.

Versuchsreihe VI.

Vergleichende Kulturversuche mit Rasse XII in dl-Tyrosinlösung bei Zusatz verschiedener Nährextrakte.

Zum Vergleich wurden noch Hefezüchtungen in etwas anders zusammengesetzten zuckerreicheren Nährlösungen vorgenommen, die Zusätze von Malz-, Malzkeim- und Hefeauszügen erfahren hatten.

Der Malzkeimextrakt wurde aus getrockneten Malzkeimen bereitet, die von Pilsener Malz der Breslauer Aktien-Malzfabrik herrührten. 100 g Malzkeime wurden in 1 Liter H_2O 1 Stunde im Kolben auf dem Baboblech gekocht. Der Auszug wurde dann durch ein Koliertuch filtriert, wobei sich etwa 400 ccm Flüssigkeit mit 4,28 g Trockensubstanz und 0,44 g Asche in 100 ccm gewinnen ließen.

Als Standardlösung diente in diesen Versuchen eine Auflösung von *2 g dl-Tyrosin*, 100 g Zucker, 1 g K_2HPO_4, 0,2 g $MgSO_4 + 7\,H_2O$, Spuren von NaCl und $FeCl_3$ in 1500 ccm destillierten Wassers.

Versuch Nr.	Zusätze zur Nährlösung	Dauer des Wachstums Wochen	Hefeernte trocken g	Vergorene Lösung: 10 ccm verbr. ccm n/10 NaOH	Vergorene Lösung: Reduktion	Vergorene Lösung: Polarisation °Sacch. $l = 2$	Tyrosol g	Unverbrauchtes Tyrosin: roh g	Unverbrauchtes Tyrosin: umkristallisiert rein g	Unverbrauchtes Tyrosin: $[\alpha]_D^{20}$
1	2g dl-Tyrosin usw. *ohne* Nährextrakt.	$3^1/_2$	0,179	0,9	+	− 9,8	0,47	1,72	0,58*)	0°
2	2g dl-Tyrosin usw. + 1 ccm Malzauszug enth. 0,1238 g Trockensubstanz	$3^1/_2$	0,386	2,1	+	−10,3	0,32	1,25	0,89	+5,8
3	2g dl-Tyrosin usw. + 1 ccm Hefeauszug enth. 0,0529 g Trockensubstanz	3	1,103	2,1	+	− 2,8	0,75	0,67	0,56	+8,4
4	2g dl-Tyrosin usw. + 1 ccm Malzkeimauszug enth. 0,0428 g Trockensubstanz	3	1,421	1,9	+	− 3,3	0,67	0,35	0,25	+8,9

*) Verluste.

Aus diesen Versuchen ist die ungemein starke stimulierende Wirkung der Substanzen des Hefe- und Malzkeimauszugs auf das Wachstum der Hefezellen und auf die Assimilation des Tyrosins besonders deutlich zu ersehen. Schon äußerlich war ein viel schnelleres Angehen der beiden Kulturen (Versuch 3 und 4), eine sehr lebhafte CO_2-Entwicklung und sehr starke Gärung zu beobachten, die früher beendet war wie in den Versuchen 1 und 2 und zu einem bedeutend intensiveren Umsatz von Zucker und Tyrosin sowie zu weit höheren Hefeausbeuten führte. Auch die Ausbeute an Tyrosol war gesteigert. Die in diesen Fällen zurückgewonnenen Aminosäurepräparate stellten ein optisch sehr reines d-Tyrosin dar. Seine Ausbeute war in dem Versuch 3 mit Hefeauszug besonders gut

und belief sich, wenn man von den beim Umkristallisieren stets unvermeidlichen Verlusten absieht, rund gerechnet auf *etwa 60 Proz. der Theorie*. Es ist noch besonders zu beachten, daß diese günstigen Effekte durch so minimale Zusätze von Hefe- und Malzkeimauszug erreicht worden sind, deren Trockensubstanzmengen *nur 2 bis 2,5 Proz.* vom angewandten Tyrosin ausmachten.

Der Malzauszug in Versuch 2 hat diesmal weniger befruchtend gewirkt. Die Hefeausbeute ist ebenso wie der Zucker- und Tyrosinverbrauch geringer als bei Zugabe der anderen Extrakte. Es ist zwar auch hier d-Tyrosin gewonnen worden, aber von geringerer optischer Reinheit, noch vermischt mit dl-Tyrosin. Vielleicht erklärt sich die geschwächte Wirksamkeit dieses Malzauszugs daher, daß er schon zu oft durch Erhitzen sterilisiert war.

Versuchsreihe VII.

Prüfung verschiedener Heferassen auf ihre Eignung zur asymmetrischen Spaltung von dl-Tyrosin bei Gegenwart von Nährwürzen.

Zur Untersuchung gelangten die obergärige Brennereihefe Rasse II, eine obergärige Bierhefe der Brauerei *Engelhardt*, Berlin[1]), und eine Hefe der Melassebrennerei *von Skene* in Klettendorf bei Breslau. Als Standard-

Versuch Nr.	Heferasse	Zusätze zur Nährlösung	Hefeernte trocken g	Vergorene Lösung: 10 ccm verbr. ccm n/10 NaOH	Vergorene Lösung: Reduktion	Vergorene Lösung: Polarisation °Sacch. $l = 2$	Tyrosol g	Unverbrauchtes Tyrosin: roh g	Unverbrauchtes Tyrosin: umkristallisiert rein g	Unverbrauchtes Tyrosin: $[\alpha]_D^{20}$
1	Rasse II	2 g dl-Tyrosin usw. + 1 ccm Hefeauszug	0,430	1,6	+	− 10,2	0,42	1,10	0,69	0°
2	Melassebrennereihefe *von Skene*	2 g dl-Tyrosin usw. + 1 ccm Hefeauszug	0,951	2,1	+	− 1,0	0,68	0,80	0,38	+ 4,51
3	Bierhefe *Engelhardt*	2 g dl-Tyrosin usw. ohne Nährwürze $p_H = 7,4$	0,211	0,8	+	− 8,5	0,29	1,01	0,74	0
4	Bierhefe *Engelhardt*	2 g dl-Tyrosin usw. + 1 ccm Malzkeimauszug $p_H = 7,5$	0,744	2,0	+	− 4,4	0,65	0,97	0,62	+ 5,42
5	Bierhefe *Engelhardt*	2 g dl-Tyrosin usw. + 1 ccm Hefeauszug $p_H = 7,5$	1,058	1,8	+	− 2,3	0,61	0,71	0,44	+ 7,52

[1]) Die Kultur dieser Hefe wurde mir vor Jahren von dem Institut für Biochemie des Kaiser Wilhelm-Instituts in Dahlem (Direktor Prof. Dr. *C. Neuberg*) freundlichst zur Verfügung gestellt und ist seitdem in der Sammlung des hiesigen Instituts dauernd fortgezüchtet worden.



lösung diente wieder die in Versuchsreihe VI benutzte mit 2 g dl-Tyrosin, Zucker und Mineralsalzen, denen Hefe- und Malzkeimauszüge in den einzelnen Gäransätzen zugefügt wurden.

In allen Versuchen dauerte das Wachstum 3 Wochen.

Auch hier zeigt sich bei der Melasse- und der Bierhefe deutlich die wachstumssteigernde Wirkung geringer Zusätze von Nährwürzen auf die Hefezellen. In diesen Versuchen ist ebenfalls eine in die Augen springende Begünstigung der Assimilation von l-Tyrosin und eine entsprechende asymmetrische Spaltung des racemischen Tyrosins erzielt worden, die bei der Engelhardthefe in Versuch 5 mit Hefeauszug zu einem überwiegend d-Tyrosin enthaltenden Produkt geführt hat. Dagegen ist die Heferasse II trotz ähnlich günstiger Kulturbedingungen in Versuch 1 in ihrem Wachstum stark zurückgeblieben und hat nur optisch-inaktives Tyrosin hinterlassen. Ob diese Erscheinung auf eine Eigenart der betreffenden Heferasse zurückzuführen ist oder ob hier Zufälligkeiten eine Rolle gespielt haben, die sich bei allen derartigen Kulturversuchen, wenn man von wenig Hefezellen ausgeht, nie ganz vermeiden lassen, bedarf weiterer Untersuchungen.

Versuchsreihe VIII.

Asymmetrische Vergärung von dl-Tyrosin durch einen Überschuß von Zucker und Preßhefe mit Zusatz von Hefeautolysat zur präparativen Darstellung von d-Tyrosin.

Die bisherigen günstigen Erfahrungen mit Zusätzen von Nährwürzen bei den Züchtungsversuchen an Hefen gaben nun Veranlassung, nachzuforschen, ob nicht auf diese Weise das früher von mir beschriebene biologische Spaltungsverfahren für racemische Aminosäuren, das bis dahin beim dl-Tyrosin immer versagt und zu optisch-inaktiven Produkten geführt hatte[1]), auch für eine einfache präparative Gewinnung von optisch reinem d-Tyrosin nutzbar zu machen war.

Die folgenden Versuche, die mit zwei verschiedenen Preßhefen des Handels angestellt waren, zeigen, daß man *durch schnelle Vergärung von dl-Tyrosin mit viel Zucker und Hefe unter Zusatz von Hefeautolysat gute Ausbeuten von optisch reinem d-Tyrosin* erzielen kann.

Vergärung ohne Hefeautolysat.

5 g dl-Tyrosin wurden zusammen mit 200 g Zucker in 4 Liter Leitungswasser kochend gelöst. Die abgekühlte Lösung wurde sofort mit 100 g frischer Preßhefe verrührt und in einer großen, mit Gärverschluß versehenen Flasche bei Zimmertemperatur zur Gärung angesetzt. Die Preßhefe war frisch bezogen und stammte aus der Preßhefefabrik in Giesmannsdorf in Schlesien. Die Gärung verlief sehr lebhaft und war nach 3 Tagen vollständig beendet. Eine Probe des Filtrats der Hefe reduzierte *Fehling*sche

[1]) *F. Ehrlich*, diese Zeitschr. **63**, 398, 1914.



Lösung nicht mehr. Die Hefe wurde sodann mittels Tonfilter abgesaugt und gründlich mit Wasser nachgewaschen. Das zuckerfreie Filtrat ergab auf dem Wasserbade, zu dünnem Sirup eingeengt, eine Kristallisation des unverbrauchten Tyrosins. Die Aminosäure wurde abgenutscht, gut mit Wasser und Alkohol gewaschen und bei 110° getrocknet. Man erhielt auf diese Weise 2,05 g noch gefärbtes Tyrosin als Rohprodukt, das beim Umkristallisieren aus Wasser unter Klärung mit Kohle und Kieselgur trocken 1,40 g reines *Tyrosin* lieferte, das *optisch-inaktiv* war.

0,8081 g Substanz, in 20 ccm 21proz. Salzsäure gelöst, d. h. $c = 4{,}04$, $l = 2$, $a_D = + 0{,}0^0$.

Aus dem eingedampften Filtrat des Tyrosins waren durch Ätherextraktion aus bicarbonatalkalischer Lösung *1,70 g* kristallisiertes *Tyrosol* zu gewinnen.

Vergärung mit Hefeautolysat.

1. *2,5 g dl-Tyrosin* wurden mit 100 g Zucker und *10 ccm* des oben beschriebenen *Hefeauszugs* in 2 Liter Leitungswasser gelöst, durch 50 g derselben im vorigen Versuch angewandten frischen Preßhefe aus Giesmannsdorf bis zum Verschwinden der Zuckerreaktion vergoren, was bereits n 2 Tagen der Fall war. Die Hefe wurde in gleicher Weise abfiltriert und gut mit Wasser nachgewaschen. Aus dem gesammelten Filtrat kristallisierte beim Eindampfen ein noch dunkelgefärbtes Tyrosin, das beim Umlösen aus Wasser unter Zusatz von Kohle und Kieselgur *0,36 g reines d-Tyrosin* mit dem richtigen Drehungsvermögen lieferte.

0,3571 g Substanz (bei 110° getrocknet) in 9 ccm 21proz. HCl gelöst. $c = 3{,}97$, $l = 1$, $a_D^{20} = + 0.35^0$.

$$[a]_D^{20} = + 8.81^0.$$

Aus der ursprünglichen Mutterlauge des Tyrosins ließ sich durch Ätherextraktion *0,54 g Tyrosol* herauslösen.

2. *5 g dl*-Tyrosin mit 200 g Zucker und *10 ccm Hefeauszug* (enthaltend 0.529 g Trockensubstanz) in 4 Litern Wasser durch 100 g Preßhefe bei Zimmertemperatur in 2 Tagen vergoren. Die Preßhefe war ganz frisch von der Hefebrennerei Union in Leipzig-Mockau bezogen. Die Aufarbeitung der vergorenen Lösung geschah genau so wie im vorigen Versuch. Zurückgewonnen 1,98 g Tyrosin als Rohprodukt. Durch zweimaliges Umkristallisieren aus Wasser wurde daraus etwa *1 g reines d-Tyrosin* in trockener Form gewonnen.

0,2567 g Substanz in 6.4 ccm 21proz. HCl gelöst. $c = 4{,}01$, $l = 1$, $a_D^{20} = + 0{,}33^0$.

$$[a]_D^{20} = + 8{,}23^0.$$

Das eingedampfte Filtrat der Gärlösung ergab nach Neutralisation mit überschüssigem $NaHCO_3$ durch erschöpfende Ätherextraktion *2,22 g kristallisiertes Tyrosol.*



Versuchsreihe IX.

Elementaranalysen einiger bei der partiellen Vergärung erhaltenen Präparate von d-Tyrosin.

Die Substanzen wurden nach dem Umkristallisieren aus Wasser jedesmal bei 110° getrocknet.

0,1125 g Substanz: 0,2439 g CO_2, 0,0657 g H_2O.
0,1370 g „ 0,2979 g CO_2, 0,0790 g H_2O.
0,1319 g „ 8,70 ccm N (18°, 746 mm).

$C_9H_{11}NO_3$. Ber.: C = 59,65 Proz., H = 6,12 Proz., N = 7,73 Proz.
Gef.: C = 59,13 „ H = 6,53 „ N = 7.59 „
C = 59,30 „ H = 6,45 „ .

Beitrag zur Chemie des Trypsins (Tryptase).

Von

Sophie Kołodziejska und Casimir Funk.

(Aus der biochemischen Abteilung der Staatlichen Hygieneschule, Warschau, Polen.)

(Eingegangen am 14. Januar 1927.)

Den größten Fortschritt in der Richtung der Reinigung und Isolierung der Fermente verdanken wir den Schulen von *Willstätter* und *v. Euler*. Was das Trypsin anbelangt, so stehen uns von den modernen Arbeiten nur die von *Willstätters* Schüler, *Waldschmidt-Leitz* (1), zur Verfügung.

Zur Darstellung des Rohferments benutzten *Willstätter* und *Waldschmidt-Leitz* (2) die folgende Methode. Frische Pankreasdrüsen, von Fett und Bindegewebe befreit, werden zu feinem Brei zerhackt und mit kleinen Acetonmengen versetzt, bis die Acetonmenge ungefähr die doppelte Menge des Breies ausmacht. Nach kurzem Stehenlassen wird die Masse filtriert und der Rückstand mit der gleichen Menge Aceton behandelt. Schließlich wird das Pulver mit ½ Volumen Aceton und ½ Volumen Äther und dann mit Äther allein gewaschen. In dieser Weise wird ein feines Pulver und ein grobfaseriger Anteil gewonnen, die sich beide als aktiv erweisen, und zwar außer dem Trypsin, Lipase, Amylase, Peptidase und Kinase enthalten. Zur Trennung von diesen Fermenten wird aus dem Trockenpräparat ein Glycerinauszug gemacht und die stärker sauer reagierende Lipase nach dem Vorgang von *Willstätter* und *Waldschmidt-Leitz* (3) mit Tonerde entfernt. Die Pankreasamylase wird nach dem Vorgang von *Willstätter*, *Waldschmidt-Leitz* und *Hesse* (4) aus dem Filtrat durch Sorption mit Kaolin entfernt. Das Erepsin (Peptidase) wird durch dreimalige Tonerdesorption bei p_H 5 entfernt. Die Enterokinase wird nach *Waldschmidt-Leitz* (4) durch Tonerdesorption bei saurer Lösung entfernt.

Die bedeutsamsten Resultate der *Willstätter-Waldschmidt-Leitz*-Methoden für das Trypsin sind die Trennung von den begleitenden Fermenten der Pankreasdrüse, sowie die Trennung in das inaktive Trypsin und die Enterokinase. Von dem Reinheitsgrad des so gewonnenen Enzyms läßt sich ein klarer Eindruck bis jetzt nicht gewinnen.



Vor einiger Zeit haben wir angegeben (5), daß es uns gelungen ist, durch Fällung mit Naphtholgelb S (Flaviansäure) in Kombination mit Pikrinsäure das Enzym quantitativ niederzuschlagen und mit größerer Wirksamkeit als das Ausgangsmaterial zu gewinnen. Am Schluß dieser Arbeit gaben wir an, daß die Fällung mit Pikrinsäure allein sich bequemer gestaltet und vielleicht aussichtsvoller ist. Diese Methode soll in dieser Arbeit geschildert werden. Wir sind uns bewußt, daß die vorliegende Arbeit erst die ersten Schritte in der Richtung der chemischen Reinigung mancher Fermente bedeutet, glauben aber, daß dieselbe vielversprechend ist. Analoge Methoden wurden auch auf andere Fermente ausgedehnt, so z. B. hat der eine von uns (*Casimir Funk*) mit Fräulein *Elblinger* die Reinigung des Pepsins vorgenommen. Hier wurde statt Pikrinsäure eine fraktionierte Fällung mit Salzen der Pikrinsäure vorgenommen, die zu einer bedeutenden Reinigung des Enzyms geführt hat. In Gemeinschaft mit *Lazarewitch* und Fräulein *Fejgin* haben wir auch eine chemische Studie des Bakteriophags begonnen, die noch nicht abgeschlossen ist. Wir suchten zu entscheiden, ob der Bakteriophag eine fermentartige Substanz darstellt oder an lebende Bakterien gebunden ist. Dies ließ sich leider noch nicht entscheiden. Wir haben nämlich verschiedene Bakteriophagen mit Pikrinsäure gefällt. Durch angestellte Kontrollen hat sich leider gezeigt, daß die Pikrinsäure nur manche Bakterien abtötet, andere dagegen am Leben läßt. Das läßt sich sehr schön an der vitalen Reduktion der Pikrinsäure zur Pikraminsäure, die im Reagenzglas stattfindet, konstatieren. Jedenfalls ist es uns gelungen, zu zeigen, daß, wenn man Bakteriophagen mit Pikrinsäure fällt und den erhaltenen Niederschlag vorsichtig in verdünnter Sodalösung, ohne Überschuß, löst, die erhaltene Lösung stark lytisch auf Bakterien wirkt. Um den Pikrinsäureniederschlag so klein wie möglich zu gestalten, wurden die Bakteriophagen liefernden Bakterien auf anorganischem Nährboden, mit einer Spur von Pepton versetzt, gezüchtet. Den erhaltenen Pikrinsäureniederschlag werden wir zu weiteren chemischen Studien verwenden.

Experimentelles.

Einer der Autoren (*Casimir Funk*) verfügt über eine ziemlich große Erfahrung über den Wert der Absorptionsmethoden auf dem Gebiete der Vitamine. Diese Methoden in seinen Händen (6) haben ergeben, daß der Absorptionsgrad so stark von den begleitenden Verunreinigungen abhängig ist, daß die Methoden kaum konstante und leicht zu wiederholende Resultate zu ergeben vermögen. Er hat sich demnach an Fällungsreaktionen gewandt, die auf dem Fermentgebiet noch viel zu wenig versucht worden sind. Es muß natürlich nicht übersehen werden, daß auch die Fällungsreaktionen zum Teil Sorptionsreaktionen

darstellen. Als Ausgangsprodukt für die vorliegende wie auch für die vorangehende Arbeit wurde Trypsin *Merck* verwandt. Die Aktivität der erhaltenen Fraktionen wurde durch Inkubation mit einer alkalisch gemachten Gelatinelösung und Bestimmung der freien Aminosäurengruppen in dem *van Slyke*schen Apparat bestimmt. Für die Versuche wurde eine 1proz. Gelatinelösung in 0,2proz. Na_2CO_3 hergestellt und unter Thymolzusatz aufbewahrt. Von Trypsin oder der erhaltenen Fraktion werden Mengen entsprechend 0,2 g Trypsin abgewogen und mit der obigen Gelatinelösung bis 50 ccm aufgefüllt und 20 Stunden im Brutschrank unter Thymolzusatz gehalten. Die Fermentwirkung wurde durch die Bestimmung des Aminostickstoffgehalts am Ende der Inkubation, nach Abzug des Anfangswertes, bestimmt. Das abgelesene Gasvolumen wurde stets auf den Barometerstand und die Temperatur korrigiert. Für jede Bestimmung wurden stets 2 ccm angewandt.

Versuche über die Fällung des Trypsins mit Pikrinsäure und Regenerierung des Trypsins aus dem Pikrat.

10 g Trypsin *Merck* wurden in 100 ccm Wasser gelöst und mit einer gesättigten Pikrinsäurelösung so lange versetzt, bis kein neuer Niederschlag mehr entsteht. Der letzte wurde nach längerem Stehenlassen abzentrifugiert und im Exsikkator zur Gewichtskonstanz getrocknet. Es wurde gefunden, daß das Trocknen die Aktivität vermindert. Die Pikrinsäurefällung wurde an verschiedenen Trypsinproben mehrere Male ausgeführt und stets gefunden, daß die Pikratausbeute etwa 5,81 Proz. des Trypsins ausmacht. Was die Aktivität des Niederschlags und des Filtrats anbelangt, so wurden folgende Zahlen erhalten:

	$NH_2 \cdot N$ in mg	Netto
Gelatinelösung allein . .	0,65	
Trypsin *Merck*	10,0	9,35
Pikrinsäurefällung . . .	4,73	4,08
Pikrinsäurefiltrat	1,0	0,35

Wie gesagt, hat es sich gezeigt, daß das Trocknen des Niederschlags die Aktivität beeinträchtigt und daß im Filtrat der Überschuß an Pikrinsäure ebenfalls störend wirkt. Das Filtrat enthält wahrscheinlich ebenfalls noch aktives Trypsin. Werden aber diese beiden Tatsachen nicht berücksichtigt, so erhalten wir durch die Fällung eine 7,5fache Reinigung des Trypsins.

Für die eventuelle Regenerierung des Trypsins aus dem Niederschlag war es wichtig, die Resistenz des Trypsins in unserer Kombination kennenzulernen. Es hat sich gezeigt, daß salzsäurehaltiger Alkohol (25 ccm HCl und 75 ccm Alkohol) die Aktivität vollständig vernichtet,

während der Kontakt mit 80 Proz. Essigsäure während 15 Minuten die Aktivität bedeutend vermindert. Temperatur von 90° vernichtet die Aktivität vollständig. Demnach zeigt sich das Trypsin in Kombination mit Pikrinsäure nicht resistenter, als das gewöhnliche Trypsin.

Dialyse. 0,1 g des Pikratniederschlags wurde in 12 ccm von 0,2proz. Sodalösung gelöst und unter Thymolzusatz in einem Kollodiumsack gegen 12 ccm destillierten Wassers 48 Stunden dialysiert. Nach dieser Zeit wurden 5 ccm der Innen- und Außenflüssigkeit zu 50 ccm mit Gelatinelösung aufgefüllt.

	NH_2·N vor der Inkubation in mg	NH_2·N nach der Inkubation in mg
Außenflüssigkeit	14,138	15,529
Innenflüssigkeit	18,662	35,945

Trypsin dialysiert demnach kaum.

Versuch Trypsinpikrinsäureniederschlag mit Nitron zu zersetzen.

Nachdem ermittelt wurde, wieviel Pikrinsäure in dem Trypsinpikrinsäureniederschlag vorhanden war, wurden 100 mg von dem Niederschlag in 0,2proz. Sodalösung gelöst und mit 3 ccm 10proz. Nitronlösung in 5proz. Essigsäurelösung gefällt. Der erhaltene Niederschlag von Nitronpikrat wurde auf einem gewogenen Jenaer Glasfilter filtriert und das Filtrat und Waschwasser auf 20 ccm aufgefüllt. Der Nitronpikratniederschlag wog 64,46 mg, wovon 27,92 mg auf die Pikrinsäure entfiel. Für die Prüfung der Wirksamkeit des Filtrats wurden 100 mg von Trypsin *Merck* mit dem Äquivalent an Trypsinpikrinsäureniederschlag und des daraus in Freiheit gesetzten Trypsins verglichen.

	NH_2·N in mg
Trypsin *Merck*	15,885
Trypsinpikrinsäureniederschlag .	14,418
Nitronpikrat-Filtrat	16,434

Nach diesem Versuch läßt sich das Trypsin aus dem Niederschlag mit Nitron regenerieren, es blieb noch zu erfahren, ob die Gegenwart von geringem Nitronüberschuß die Trypsinaktivität nicht zu vermindern vermag. Wie wir gleich sehen werden, ist das tatsächlich zum geringen Teil der Fall.

	NH_2·N vor der Inkubation in mg	NH_2·N nach der Inkubation in mg
50 mg Trypsin *Merck*	10,75	20,83
Dasselbe mit 1 ccm Nitronlösung . . .	11,03	17,46



Die Gegenwart von Nitron erniedrigte die Aktivität des Trypsins um 36 Proz.

Qualitative Proben des Trypsinpikrinsäureniederschlags ergaben einen deutlichen Gehalt an Schwefel, Phosphor und Kohlehydraten. die Anwesenheit von Purinsubstanzen darin ließ sich nicht mit Sicherheit konstatieren.

Versuche, den Trypsinpikrinsäureniederschlag zu fraktionieren.

Fraktionierung mit Äther. Eine nicht gewogene Menge des Pikrats wurde im Soxhlet extrahiert, was einige Tage dauerte. Es wurde der Eindruck gewonnen, daß der Niederschlag selbst durch die Hülse hindurchgeht, was auch tatsächlich der Fall war, und deswegen wurde der Versuch unterbrochen. Es hat sich herausgestellt, daß nur die Pikrinsäure extrahiert wurde.

	$NH_2 \cdot N$ vor der Inkubation in mg	$NH_2 \cdot N$ nach der Inkubation in mg
50 mg Niederschlag vom Boden des Extraktionskölbchens gewonnen	18,13	31,54
50 mg Niederschlag aus der Hülse	18,14	31,55
50 mg des ätherlöslichen Rückstandes	19,21	19,56

Fraktionierung mit Aceton. 826 mg des Trypsinpikrinsäureniederschlags wurden zuerst mit 100 Proz. Aceton, was übrig blieb mit 90 Proz. und schließlich mit 80 proz. Aceton extrahiert. Der letzte Rückstand wurde leider nicht untersucht.

I. Fraktion	(100 Proz. Aceton)	hellgelb	17,9 mg
II. „	(90 „ „)	hellbraun	90,9 „
III. „	(80 „ „)	gelb	82,8 „

	$NH_2 \cdot N$ vor der Inkubation in mg	$NH_2 \cdot N$ nach der Inkubation in mg
I. Fraktion 15 mg genommen	17,47	19,775
II. „ 50 mg „	16,345	21,423
III. „ 50 mg „	20,98	20,875

Die ersten zwei Fraktionen erwiesen sich als aktiv, die dritte inaktiv, es ist demnach möglich, daß die Fraktionierung mit Aceton sich als zweckmäßig erweisen wird.

Fraktionierung des Niederschlags als Natriumsalz. 786 mg wurden in 4 ccm 1 proz. Sodalösung gelöst. Von dem nicht gelösten wurde abfiltriert und zu dem Filtrat wurde die 20 fache Menge Alkohol zugesetzt.



Die Lösung wurde langsam abgedunstet, es bilden sich zuerst ölige Tropfen, später fällt ein Niederschlag aus, der 61,3 mg wog und unter dem Mikroskop kristallinisch aussah. Es wurde versucht, den Niederschlag in 5 ccm Wasser zu lösen, was nur teilweise gelang. Daher wurde von dem ungelösten abzentrifugiert, der Niederschlag und die Mutterlauge II auf Aktivität geprüft.

	$NH_2 \cdot N$ vor der Inkubation in mg	$NH_2 \cdot N$ nach der Inkubation in mg
Alkohol, Filtrat, nach dem Abdunsten des Alkohols	24,916	25,504
Niederschlag in Sodalösung gelöst	17,72	31,54
Filtrat II	24,91	40,5

Der kristallinische Niederschlag und der lösliche Teil davon erwiesen sich beide als aktiv, doch hat sich die Gesamtaktivität sehr stark verringert. Der Versuch wurde wiederholt, indem 440,4 mg des Trypsinpikrinsäureniederschlags in Arbeit genommen wurden. Diese Menge wurde in n/10 Sodalösung gelöst, von dem unlöslichen Anteil wurde abfiltriert und das Filtrat mit dem 20fachen Volumen Alkohol versetzt. Durch Alkoholzusatz fällt ein Niedersehlag aus, der nach dem Trocknen 21 mg betrug. Der alkoholische Extrakt erwies sich als schwach aktiv, der Niederschlag dagegen als inaktiv. Das Trypsin wird durch alkoholische Fällung des Natriumsalzes hauptsächlich inaktiviert, doch ist es fraglich, ob hier eine wirkliche Inaktivierung oder aber eine Trennung in inaktives Trypsin und Kinase stattfindet.

Versuch,
den Trypsinpikrinsäureniederschlag als Natriumsalz zu kristallisieren.

50 mg des Niederschlags wurden in 5 ccm von einer 0,2proz. Sodalösung gelöst und in einem Exsikkator langsam verdunstet. Es bildeten sich schöne Nadeln. Die Kristalle wurden abgetrennt, mit wenig Sodalösung gewaschen und nebst der Mutterlauge auf Wirksamkeit geprüft.

	$NH_2 \cdot N$ vor der Inkubation in mg	$NH_2 \cdot N$ nach der Inkubation in mg
Kristalle	16,05	20,9
Mutterlauge	18,27	26,75

Die Summe der Wirkungen der beiden Fraktionen glich ungefähr der Aktivität des Ausgangsmaterials. Auch diese Methode scheint aussichtsvoll zu sein.



Versuch der Fraktionierung in Form des Bariumsalzes.

5 g von Trypsin *Merck* wurden in Wasser gelöst und mit einer gesättigten Pikrinsäurelösung gefällt. Nach 24stündigem Stehenlassen wurde der Niederschlag abzentrifugiert und in 50 ccm einer 0,3proz. Sodalösung gelöst. Beim Lösen des Niederschlags in Sodalösung wird beobachtet, daß die ersten Portionen sich gelb färben, während der schwerlösliche Rückstand immer mehr farblos wird, indem er in eine Gallerte umgewandelt wird. Der alkalische Extrakt wurde mit Pikrinsäure ausgefällt, der Niederschlag abgeschleudert und im feuchten Zustande in minimal ausreichender Menge einer 0,3proz. Barytlösung gelöst. Die leichte, bleibende Trübung wurde abgeschleudert und das Filtrat langsam in einem Vakuumexsikkator abgedunstet. Die Kristalle, die gebildet wurden, wurden abfiltriert und wogen 6,8 mg.

	NH_2·N vor der Inkubation in mg	NH_2·N nach der Inkubation in mg
Kristalle	16,302	19,146
Filtrat	28,8	23,52

Die Kristalle erwiesen sich als aktiv, während im Filtrat die Aktivität offenbar gehemmt wurde.

Versuche, den Trypsinpikrinsäureniederschlag umzufällen.

5 g Trypsin *Merck* wurden in 15 ccm Wasser gelöst und mit Pikrinsäure gefällt. Der erhaltene Niederschlag nach dem Auswaschen und Trocknen betrug 290,9 mg oder 5,81 Proz. des angewandten Trypsins. Wird dieser Niederschlag in 20 ccm 0,2proz. Sodalösung gelöst, von dem unlöslichen Anteil abgeschleudert und das Filtrat wieder mit Pikrinsäure gefällt, so fällt eine viel geringere Menge des Pikrats aus. Sie betrug nämlich nur 28,4 mg oder 0,58 Proz. des angewandten Trypsins. Dieser zweite Niederschlag sieht zuerst wachsartig aus, scheint aber nach dem Trocknen kristallinisch zu werden. Diese Methode wurde mehrmals wiederholt, und es wurden Ausbeuten bis zu 1 Proz. des Ausgangsmaterials erhalten. Was die Aktivität dieser Fraktion sowie der Mutterlauge anbetrifft, so ist dieselbe nicht leicht zu prüfen, und unsere Versuche darüber sind nicht als endgültig zu betrachten. Im ersten Versuch war der zweite Niederschlag wie auch das Filtrat vollständig inaktiv, dagegen schien die Kombination von beiden Anteilen aktiv zu sein. Es schien in diesem Falle, als ob die Umfällung mit Pikrinsäure das Trypsin in das inaktive Trypsin und die Kinase zu trennen vermochte.



	$NH_2 \cdot N$ vor der Inkubation in mg	$NH_2 \cdot N$ nach der Inkubation in mg
Niederschlag	9,045	9,425
Filtrat	13,66	13,24
Hälfte des Niederschlags und Hälfte des Filtrats .	25,68	33,09

Später aber stellte es sich heraus, daß, wenn der zweite Niederschlag nicht getrocknet wird, sondern feucht geprüft wird, doch eine Aktivität zum Vorschein kommt. Dasselbe gilt vielleicht auch für das Filtrat, wenn der störende Überschuß an Pikrinsäure mit Nitron entfernt wird. Dafür mögen die folgenden Zahlen als Beleg dienen:

	$NH_2 \cdot N$ vor der Inkubation in mg	$NH_2 \cdot N$ nach der Inkubation in mg	Netto
Gelatinelösung allein		0,65	
Trypsin *Merck*		10,0	9,35
Erster Pikrinsäureniederschlag	9,31	14,04	4,08
Filtrat der I. Fällung	10,57	11,57	0,35
Filtrat d. I. Fällung nach Fällen mit Nitron	8,85	9,57	0,07
Erster Pikrinsäureniederschlag zusammen mit Filtrat I (nach Nitronfällung) . . .	9,99	13,15	2,51
Zweite Pikrinsäurefällung	9,27	12,7	2,78
Filtrat II der Pikrinsäurefällung	8,70	9,03	— 0,32
Filtrat II nach Nitronfällung	9,28	7,72	— 2,21
II. Fällung und Filtrat II nach Nitronfällung	8,56	13,58	4,37

Wenn wir diese Versuche zusammenfassen, so ergibt sich, daß der erste Pikrinsäureniederschlag zwar weniger wirksam ist als das Ausgangsmaterial, aber doch 7,5mal gereinigt wurde. Der zweite Pikrinsäureniederschlag war 3,3mal weniger aktiv, erfuhr jedoch eine Reinigung von 52mal. Die Aktivität des zweiten Niederschlags, zusammen mit dem zweiten Filtrat, ergab eine Verringerung von 2,1mal, doch kann das Trypsin als 82mal gereinigt betrachtet werden. Wir sind uns wohl bewußt, daß unsere Versuche nur die ersten Schritte in der chemischen Bearbeitung der Fermente bedeuten. Im Laufe dieser Versuche waren wir aber oft erstaunt, welchen drastischen Manipulationen die Fermente ausgesetzt werden können, ohne viel an Wirksamkeit zu verlieren. Es scheint uns, daß neben den epochemachenden Adsorptionsmethoden von *Willstätter* und *v. Euler* auch die Fällungsmethoden bei der Reindarstellung der Fermente gute Dienste leisten können.

Zusammenfassung.

Durch Fällen des Trypsins mit Pikrinsäure gelingt es, einen aktiven Niederschlag zu bekommen, aus welchem durch Nitron das Trypsin regeneriert werden kann. Durch Fraktionieren des Pikrinsäurenieder-

schlags mit Aceton, besonders aber durch Umwandlung in das Natrium- oder Bariumsalz, lassen sich kristallinische Fraktionen abscheiden, die noch über eine bedeutende Aktivität verfügen. Durch Umfällen der Pikrinsäureverbindung läßt sich das Trypsin 52 mal reinigen, wobei aber eine teilweise Trennung in das Ferment und die Kinase aufzutreten scheint.

Literatur.

1) *Waldschmidt-Leitz*, Die Fermente 1926; *H. v. Euler*, Chemie der Enzyme, II. Teil, II. Abschnitt, 1927. — 2) *Willstätter* und *Waldschmidt-Leitz*, H. **125**, 132, 1923. — 3) *Willstätter*, *Waldschmidt-Leitz* und *Hesse*, H. **126**, 143, 1923. — 4) *Waldschmidt-Leitz*, H. **132**, 181, 1923/24. — 5) *Sophie Kołodziejska* und *Casimir Funk*, Chemie der Zelle und Gewebe **13**, 46, 1926. — *Funk*, Die Vitamine, III. Aufl. München, J. F. Bergmann.

Verhalten der Hexosen sowie Hexosen-mono-phosphorsäure-ester zu Serum und Aminosäuren.

Von

C. Neuberg und M. Kobel.

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für Biochemie in Berlin-Dahlem.)

Am Stoffpaar d, l-Alanin und d-Fructose haben wir zuerst für Zucker und Aminosäure die Fähigkeit festgestellt[1]), in eine bei Raumtemperatur *sofort sich offenbarende und polarimetrisch meßbare Beziehung* zu treten. Die Weiterverfolgung[2]) dieser Beobachtung hat sodann ergeben, daß einerseits das d, l-Alanin bei diesem Vorgang durch andere Aminosäuren wie l(+)-Alanin, l(+)-Asparaginsäure und d(+)-Glutaminsäure (letztere beiden als neutral reagierende Mononatriumsalze) ersetzt und daß andererseits statt des Fruchtzuckers das physiologisch wichtige Hexose-di-phosphat benutzt werden kann. Welcher Art die sich abspielenden Vorgänge sind, bleibe unerörtert. Eine tiefgreifende Veränderung der beiden Komponenten kommt bei der Entstehung der „Addukte" jedenfalls *nicht* in Betracht; denn wir haben (l. c.) gezeigt, daß die Kohlenhydrate in den Drehungsänderung aufweisenden Aminosäure-Zucker-Gemischen von Hefen in normaler Weise, zum Teil sogar beschleunigt, vergoren werden. Weiterhin hat sich ergeben, daß statt der genannten Mono-aminosäuren auch andere stickstoffhaltige Substanzen einen ähnlichen Einfluß auf die Rotation ausüben, z. B. Harnstoff, Thioharnstoff, Argininnitrat. Ausgesprochen waren diese momentan eintretenden Drehungsänderungen bei der Fructose und dem Kohlenhydrat-di-phosphorsäure-ester, während Glucose nur geringe Ausschläge lieferte. Der Hergang ist ganz verschieden von den sonst bekannten Umsetzungen der Kohlenhydrate mit Aminosäuren oder Harnstoff, die zu weitgehenden Zerstörungen der beiden Komponenten führen, wie Kohlensäureentwicklung,

---

[1]) *C. Neuberg* und *M. Kobel,* diese Zeitschr. **162**, 496, 1925.

[2]) *Dieselben,* ebendaselbst **174**, 464, 1926.

Ammoniakabspaltung und Huminbildung. Im Gegensatz zu diesen tiefgreifenden Veränderungen, die während längerer Einwirkungsdauer und bei hohen Wärmegraden, oft auch bei alkalischer Reaktion erzielt sind, stellen sich die von uns beschriebenen Erscheinungen augenblicklich und bei gewöhnlicher Temperatur ein. Daß sie von den langsam verlaufenden Reaktionen abzutrennen sind, haben jüngst *H. v. Euler* und *E. Brunius*[1]) bestätigt, die sich von anderen Gesichtspunkten her sowie mit einer abweichenden Methodik (kryoskopischer Messung) mit dem Problem der Umsetzung von Zucker und Aminen neuerdings beschäftigt haben.

Im Hinblick auf die sich aufdrängenden Fragen der Blutzucker- und Gärungsphysiologie, für welche die beschriebenen Erscheinungen von Interesse sind, haben wir des weiteren[2]) die Studien über Drehungsänderungen beim Zusammentreffen von Zucker mit stickstoffhaltigen Gebilden auf das System Zucker bzw. Zucker-phosphorsäure-ester und Hefen-mazerationssaft ausgedehnt. Um Störungen durch desmolytischen Zuckerabbau auszuschließen, mußte ein Hefensaft verwendet werden, dem durch Aufbewahren seine zymatische Kraft genommen war. Schon von der Darstellung her enthält Hefensaft außer koagulabelem Protein abgebautes Eiweiß und andere lösliche, stickstoffhaltige Materialien, insbesondere Nucleinsäuren und deren Spaltungsprodukte. Daß sich deren Menge in gestandenem Mazerationssaft vergrößert, ist nicht zu vermeiden, da proteolytische Prozesse durch die vorhandenen eiweißspaltenden Fermente ausgelöst werden. Die mit Hefensaft ein-

[1]) *H. v. Euler* und *E. Brunius*, H. **161**, 266, 1926. Die dort gestellte Frage der Autoren, was wir unter „natürlichen Verhältnissen" verstehen, erfährt, wie wir glauben, unzweideutig aus dem Zusammenhang ihre Beantwortung. *v. Euler* und *Josephson* schreiben (H. **153**, 8, 1926), „daß ein in alkalischer Lösung aus Glucose entstehendes Umwandlungsprodukt mit der Aminogruppe reagiert". Dagegen hatten wir im betonten Gegensatz zu jeder Methodik, die eine Zugabe irgendwelcher Katalysatoren beansprucht, es gerade vermieden, die von Natur aus gegebene Wasserstoffionenkonzentration der Komponenten zu ändern und eine Entfernung vom Neutralpunkt herbeizuführen. Die Herstellung der Neutralitätszone ($p_H = 7$) erwies sich als notwendig bei der Asparaginsäure und Glutaminsäure, die an sich starke Säuren sind, aber nach *C. Neuberg* und *M. Kobel* (diese Zeitschr. **174**, 465, 1926) sowie *M. Bergmann*, *F. Stern* und *Ch. Witte* (A. **449**, 282, 1926) neutral reagierende Mono-natriumsalze bilden. Natürlich mußte auch der Hexose-di-phosphorsäure-ester, der erhebliche Acidität aufweist, in Form eines neutralen Salzes verwendet werden. Nachdem nun *v. Euler* und *Brunius* den von uns hervorgehobenen Unterschied im Verhalten von Fruchtzucker und Glucose bei der momentan sich abspielenden Erscheinung anerkennen, bestehen unseres Erachtens keine tatsächlichen Divergenzen gegenüber den interessanten Befunden dieser Autoren.

[2]) *C. Neuberg* und *M. Kobel*, diese Zeitschr. **179**, 451, 1926.



tretenden Drehungsänderungen können somit nur auf die Gesamtheit der Zellinhaltsstoffe, nicht aber allein auf genuines Hefeneiweiß bezogen werden. Der Hefensaft selbst erlangt nach einiger Zeit eine konstante Rotationskraft. In diesem Zustande reagiert er dann auf das deutlichste mit Fruchtzucker, mit Hexose-di-phosphorsäure, mit dem aus letzterer durch künstliche Dephosphorylierung bereiteten *Neuberg*schen Hexose-mono-phosphorsäure-ester sowie mit dem auf dem Gärungswege gewinnbaren isomeren Zymo-mono-phosphat von *Robison*. Die Drehungsänderungen sind teils nach rechts, teils nach links gerichtet.

Zur Vervollständigung haben wir nunmehr Versuche mit normalem, ganz *frischem Pferdeserum* ausgeführt, das, wenn überhaupt, nur einer geringfügigen Autolyse unterliegt.

Dabei hat sich ergeben, daß *Glucose* und *Fructose im Gemisch mit Serum* eine Drehungsänderung gegenüber dem Betrag erleiden, der sich aus der Ablenkung der ungemischten Komponenten ergibt. Die Drehungsänderung, die Fructose verursacht, ist nach links gerichtet, die von Glucose bewirkte ist schwächer und weist nach rechts. Die Ausschläge sind aber von geringerer Größenordnung als bei den Systemen Fruchtzucker und einfachen Aminosäuren.

Die mit Albumosen und Peptonen erzielten Daten wollen wir vorläufig nicht anführen; denn die käuflichen Präparate dieser Eiweißabbaustufen sind Gemische von Körpern sehr verschiedener Molekulargröße und enthalten, wie wir fanden, auch Ammoniumsalze sowie Spaltungsprodukte von Nucleinsäuren. Daß diese Stoffe mit den Zuckern reagieren können, haben wir schon in unserer letzten Mitteilung erwähnt. Wir wollen aber gereinigte Proteosen zum Gegenstand einer ausführlicheren Prüfung machen; *Caseinpepton* besonderer Fertigung ergab im Zucker-Misch-Versuch *keinen Effekt*.

Deutlich zeigte sich weiterhin, daß die bisher in *ihrem Verhalten zu Aminosäuren* nicht untersuchten *drei Hexose-mono-phosphorsäure-ester erhebliche polarimetrische Ausschläge* liefern. Wiederum waren es Asparaginat und Glutaminat, die beim *Robison*schen Ester, beim *Neuberg*schen Ester und beim *Glucose-mono-phosphat* (aus Rohrzucker-mono-phosphorsäure) die stärksten Drehungsänderungen veranlaßten. Auffallenderweise sind Alanin und Harnstoff den genannten Zuckerphosphaten gegenüber ohne wesentlichen Einfluß (Tabellen III, IIIa, IV, IVa, VIII, VIIIa, IX, IXa, XIII, XIIIa, XIV, XIVa), während sich Asparaginat und Glutaminat, wie erwähnt, auch gegenüber einfacher Fructose in dieser Beziehung als die wirksamsten Aminosäuren erweisen. Es ist unentschieden, ob man in dieser, wie auch immer gearteten, durch den polarimetrischen Effekt gekennzeichneten Beziehung zwischen Zucker und Aminosäure den Auftakt zu den komplexen und destruktiven Umsetzungen erblicken darf, die im

Verlauf der Entstehung von Humin sich abspielen. Daß im Neutralisationsbereich die Glucose nicht deutlich auf die erwähnten Eiweißspaltungsprodukte anspricht, zum Unterschiede von der augenblicklich reagierenden Fructose, würde an sich zu einer solchen Annahme keinen Gegensatz bedeuten, weil ja die Huminbildung unter Verhältnissen erzwungen wird, unter denen auch der Traubenzucker labil wird.

Unsere Feststellungen haben keine Beziehungen zu der von *H. Pringsheim* und *M. Winter*[1]) postulierten Kondensation, die zwischen Eiweißkörpern und reduzierenden Zuckern augenblicklich erfolgen soll. Mit vier voneinander unabhängigen Methoden (Dialyse, Ausflockung der Proteine bei neutraler Reaktion, Trennung mittels Alkohol und Bestimmung nach einem nicht auf Abscheidung von Kupferoxydul[2]) beruhenden Titrationsverfahren) läßt sich, wie *Neuberg* und *Simon* an anderer Stelle mitteilen werden, dartun, daß innerhalb der analytischen Fehlergrenzen die gesamte angeblich gebundene Kohlenhydratmenge als freier Zucker nachzuweisen ist.

Tabelle I.

m/2 hexose-mono-phosphorsaures Natrium (nach *Neuberg*) + 2 m Natrium-asparaginat. $p_H = 7,0$.

Zeit	3 ccm m/2 Hexosephosphat + 3 ccm Wasser	3 ccm 2 m Asparaginat + 3 ccm Wasser	3 ccm m/2 Hexosephosphat + 3 ccm 2 m Asparaginat	Δ (l = 1 dcm)
Zu Beginn . .	+ 0,92°	— 0,66°	+ 1,07°	0,81°
Nach 1 Std. . .	+ 0,92	— 0,66	+ 1,06	0,80
„ 2 „ . . .	+ 0,91	— 0,66	+ 1,06	0,81
„ 4 „ . .	+ 0,92	— 0,65	+ 1,06	0,79
„ 20 „ . .	+ 0,92	— 0,65	+ 1,06	0,79

Drehungsänderung nach rechts.

Tabelle Ia.

m/2 hexose-mono-phosphorsaures Natrium (nach *Neuberg*) + 2 m Natrium-asparaginat. $p_H = 7,0$.

Zeit	3 ccm m/2 Hexosephosphat + 3 ccm Wasser	3 ccm 2 m Asparaginat + 3 ccm Wasser	3 ccm m/2 Hexosephosphat + 3 ccm 2 m Asparaginat	Δ (l = 1 dcm)
Zu Beginn . .	+ 0,92°	— 0,66°	+ 1,06°	0,80°
Nach 1 Std. . .	+ 0,92	— 0,66	+ 1,08	0,82
„ 4 „ . .	+ 0,92	— 0,66	+ 1,07	0,81

Drehungsänderung nach rechts.

[1]) *H. Pringsheim* und *M. Winter*, B. **60**, 278, 1927.

[2]) Besonders halten *Albumosen* und *Peptone* beträchtlich Kupferoxydul in Lösung, wie schon früher hervorgehoben ist (*C. Neuberg* und *M. Ishida*, diese Zeitschr. **37**, 142, 1911 und **48**, 503, 1912).

Tabelle II.

m/2 hexose-mono-phosphorsaures Natrium (nach *Neuberg*) + 2 m Natrium-glutaminat. $p_H = 7,0$.

Zeit	3 ccm m/2 Hexosephosphat + 3 ccm Wasser	3 ccm 2 m Glutaminat + 3 ccm Wasser	3 ccm m/2 Hexosephosphat + 3 ccm 2 m Glutaminat	Δ (l = 1 dcm)
Zu Beginn . .	+ 0,90°	— 0,42°	+ 0,76°	0,28°
Nach 1 Std. . .	+ 0,90	— 0,42	+ 0,75	0,27
„ 2 „ . .	+ 0,91	— 0,42	+ 0,76	0,27
„ 10 „ . .	+ 0,90	— 0,43	+ 0,76	0,29

Drehungsänderung nach rechts.

Tabelle IIa.

m/2 hexose-mono-phosphorsaures Natrium (nach *Neuberg*) + 2 m Natrium-glutaminat. $p_H = 7,0$.

Zeit	3 ccm m/2 Hexosephosphat + 3 ccm Wasser	3 ccm 2 m Glutaminat + 3 ccm Wasser	3 ccm m/2 Hexosephosphat + 3 ccm 2 m Glutaminat	Δ (l = 1 dcm)
Zu Beginn . .	+ 0,91°	— 0,42°	+ 0,80°	0,31°
Nach 1 Std. . .	+ 0,91	— 0,42	+ 0,79	0,30
„ 20 „ . .	+ 0,91	— 0,42	+ 0,80	0,31

Drehungsänderung nach rechts.

Tabelle III.

m/2 hexose-mono-phosphorsaures Natrium (nach *Neuberg*) + 2 m d, l-Alanin. $p_H = 7,0$.

Zeit	3 ccm m/2 Hexose-phosphat + 3 ccm Wasser	3 ccm m/2 Hexose-phosphat + 3 ccm 2 m d, l-Alanin	Δ (l = 1 dcm)
Zu Beginn	+ 0,90°	+ 0,96°	0,06°
Nach 1 Std.	+ 0,90	+ 0,96	0,06
„ 2 „	+ 0,90	+ 0,97	0,07
„ 20 „	+ 0,90	+ 0,96	0,06

Drehungsänderung nach rechts.

Tabelle IIIa.

m/2 hexose-mono-phosphorsaures Natrium (nach *Neuberg*) + 2 m d, l-Alanin. $p_H = 7,0$.

Zeit	3 ccm m/2 Hexose-phosphat + 3 ccm Wasser	3 ccm m/2 Hexose-phosphat + 3 ccm 2 m d, l-Alanin	Δ (l = 1 dcm)
Zu Beginn	+ 0,91°	+ 0,97°	0,06°
Nach 2 Stdn.	+ 0,91	+ 0,96	0,05
„ 4 „	+ 0,91	+ 0,97	0,06

Drehungsänderung nach rechts.

Tabelle IV.

m/2 hexose-mono-phosphorsaures Natrium (nach *Neuberg*) + 6 m Harnstoff. $p_H = 7{,}0$.

Zeit	3 ccm m/2 Hexosephosphat + 3 ccm Wasser	3 ccm m/2 Hexosephosphat + 3 ccm 6 m Harnstoff	Δ (l = 1 dcm)
Zu Beginn	+ 0,92°	+ 1,02°	0,10°
Nach 1 Std.	+ 0,92	+ 1,02	0,10
„ 4 „	+ 0,92	+ 1,02	0,10
„ 24 „	+ 0,92	+ 1,01	0,09

Drehungsänderung nach rechts.

Tabelle IV a.

m/2 hexose-mono-phosphorsaures Natrium (nach *Neuberg*) + 6 m Harnstoff. $p_H = 7{,}0$.

Zeit	3 ccm m/2 Hexosephosphat + 3 ccm Wasser	3 ccm m/2 Hexosephosphat + 3 ccm 6 m Harnstoff	Δ (l = 1 dcm)
Zu Beginn	+ 0,92°	+ 1,02°	0,10°
Nach 2 Stdn.	+ 0,92	+ 1,01	0,09
„ 4 „	+ 0,92	+ 1,02	0,10

Drehungsänderung nach rechts.

Tabelle V.

m/2 hexose-mono-phosphorsaures Natrium (nach *Neuberg*) + Pferdeserum.

Zeit	3 ccm m/2 Hexosephosphat + 3 ccm Wasser	3 ccm Serum + 3 ccm Wasser	3 ccm m/2 Hexosephosphat + 3 ccm Serum	Δ (l = 1 dcm)
Zu Beginn . .	+ 0,92°	— 1,80°	— 0,84°	0,04°
Nach 1 Std. . .	+ 0,92	— 1,80	— 0,84	0,04
„ 2 „ . .	+ 0,91	— 1,80	— 0,85	0,04
„ 4 „ . .	+ 0,92	— 1,80	— 0,84	0,04
„ 20 „ . .	+ 0,92	— 1,80	— 0,84	0,04

Drehungsänderung nach rechts.

Tabelle V a.

m/2 hexose-mono-phosphorsaures Natrium (nach *Neuberg*) + Pferdeserum.

Zeit	3 ccm m/2 Hexosephosphat + 3 ccm Wasser	3 ccm Serum + 3 ccm Wasser	3 ccm m/2 Hexosephosphat + 3 ccm Serum	Δ (l = 1 dcm)
Zu Beginn . .	+ 0,93°	— 1,80°	— 0,83°	0,04°
Nach 1 Std. . .	+ 0,93	— 1,80	— 0,82	0,05
„ 4 „ . .	+ 0,93	— 1,80	— 0,83	0,04

Drehungsänderung nach rechts.

Tabelle VI.

m/2 hexose-mono-phosphorsaures Natrium (nach *Robison*) + 2 m Natrium-asparaginat. $p_H = 7,0$.

Zeit	3 ccm m/2 Zymo-mono-phosphat + 3 ccm Wasser	3 ccm 2 m Asparaginat + 3 ccm Wasser	3 ccm m/2 Zymo-mono-phosphat + 3 ccm 2 m Asparaginat	Δ (l = 1 dcm)
Zu Beginn . .	+ 1,33°	— 0,68°	+ 1,32°	0,67°
Nach 2 Stdn. .	+ 1,33	— 0,67	+ 1,32	0,66
„ 4 „ . .	+ 1,33	— 0,68	+ 1,32	0,67
„ 10 „ . .	+ 1,33	— 0,66	+ 1,33	0,66

Drehungsänderung nach rechts.

Tabelle VI a.

m/2 hexose-mono-phosphorsaures Natrium (nach *Robison*) + 2 m Natrium-asparaginat. $p_H = 7,0$.

Zeit	3 ccm m/2 Zymo-mono-phosphat + 3 ccm Wasser	3 ccm 2 m Asparaginat + 3ccm Wasser	3 ccm m/2 Zymo-mono-phosphat + 3 ccm 2 m Asparaginat	Δ (l = 1 dcm)
Zu Beginn . .	+ 1,33°	+ 0,68°	+ 1,31°	0,66°
Nach 1 Std. . .	+ 1,33	+ 0,68	+ 1,30	0,65
„ 4 „ . .	+ 1,33	+ 0,67	+ 1,31	0,65

Drehungsänderung nach rechts.

Tabelle VII.

m/2 hexose-mono-phosphorsaures Natrium (nach *Robison*) + 2 m Natrium-glutaminat. $p_H = 7,0$.

Zeit	3 ccm m/2 Zymo-mono-phosphat + 3 ccm Wasser	3 ccm 2 m Glut-aminat + 3 ccm Wasser	3 ccm m/2 Zymo-mono-phosphat + 3 ccm 2 m Glutaminat	Δ (l = 1 dcm)
Zu Beginn . .	+ 1,33°	— 0,47°	+ 1,16°	0,30°
Nach 1 Std. . .	+ 1,33	— 0,47	+ 1,16	0,30
„ 2 „ . .	+ 1,34	— 0,46	+ 1,17	0,29
„ 20 „ . .	+ 1,33	— 0,46	+ 1,17	0,30

Drehungsänderung nach rechts.

Tabelle VII a.

m/2 hexose-mono-phosphorsaures Natrium (nach *Robison*) + 2 m Natrium-glutaminat. $p_H = 7,0$.

Zeit	3 ccm m/2 Zymo-mono-phosphat + 3 ccm Wasser	3 ccm 2 m Glut-aminat + 3 ccm Wasser	3 ccm m/2 Zymo-mono-phosphat + 3 ccm 2 m Glutaminat	Δ (l = 1 dcm)
Zu Beginn . .	+ 1,33°	— 0,45°	+ 1,14°	0,26°
Nach 1 Std. . .	+ 1,33	— 0,45	+ 1,15	0,27
„ 3 „ . .	+ 1,33	— 0,46	+ 1,15	0,28

Drehungsänderung nach rechts.

Tabelle VIII.

m/2 hexose-mono-phosphorsaures Natrium (nach *Robison*) + 2 m d,l-Alanin. $p_H = 7,0$.

Zeit	3 ccm m/2 Zymo-mono-phosphat + 3 ccm Wasser	3 ccm m/2 Zymo-mono-phosphat + 3 ccm 2 m d,l-Alanin	Δ (l = 1 dcm)
Zu Beginn . . .	+ 1,33°	+ 1,35°	0,02°
Nach 2 Stdn. . .	+ 1,34	+ 1,35	0,01
„ 24 „ . .	+ 1,33	+ 1,34	0,01
„ 48 „ . .	+ 1,33	+ 1,34	0,01

Tabelle VIIIa.

m/2 hexose-mono-phosphorsaures Natrium (nach *Robison*) + 2 m d,l-Alanin. $p_H = 7,0$.

Zeit	3 ccm m/2 Zymo-mono-phosphat + 3 ccm Wasser	3 ccm m/2 Zymo-mono-phosphat + 3 ccm 2 m d,l-Alanin	Δ (l = 1 dcm)
Zu Beginn . . .	+ 1,32°	+ 1,33°	0,01°
Nach 2 Stdn. . .	+ 1,32	+ 1,32	0,00
„ 4 „ . .	+ 1,32	+ 1,33	0,01

Tabelle IX.

m/2 hexose-mono-phosphorsaures Natrium (nach *Robison*) + 6 m Harnstoff. $p_H = 7,0$.

Zeit	3 ccm m/2 Zymo-mono-phosphat + 3 ccm Wasser	3 ccm m/2 Zymo-mono-phosphat + 3 ccm 6 m Harnstoff	Δ (l = 1 dcm)
Zu Beginn . . .	+ 1,33°	+ 1,36°	0,03°
Nach 2 Stdn. . .	+ 1,34	+ 1,36	0,02
„ 24 „ . .	+ 1,33	+ 1,36	0,03
„ 48 „ . .	+ 1,33	+ 1,36	0,03

Drehungsänderung nach rechts.

Tabelle IXa.

m/2 hexose-mono-phosphorsaures Natrium (nach *Robison*) + 6 m Harnstoff. $p_H = 7,0$.

Zeit	3 ccm m/2 Zymo-mono-phosphat + 3 ccm Wasser	3 ccm m/2 Zymo-mono-phosphat + 3 ccm 6 m Harnstoff	Δ (l = 1 dcm)
Zu Beginn . . .	+ 1,32°	+ 1,36°	0,04°
Nach 2 Stdn. . .	+ 1,32	+ 1,36	0,04
„ 4 „ . .	+ 1,32	+ 1,36	0,04

Drehungsänderung nach rechts.

Tabelle X.

m/2 hexose-mono-phosphorsaures Natrium (nach *Robison*) + Pferdeserum.

Zeit	3 ccm m/2 Zymo-mono-phosphat + 3 ccm Wasser	3 ccm Serum + 3 ccm Wasser	3 ccm m/2 Zymo-mono-phosphat + 3 ccm Serum	Δ (l = 1 dcm)
Zu Beginn . .	+ 1,32°	— 1,80°	— 0,49°	0,01°
Nach 1 Std. . .	+ 1,32	— 1,80	— 0,49	0,01
„ 2 „ . .	+ 1,31	— 1,80	— 0,50	0,01
„ 20 „ . .	+ 1,32	— 1,80	— 0,50	0,02

Tabelle Xa.

m/2 hexose-mono-phosphorsaures Natrium (nach *Robison*) + Pferdeserum.

Zeit	3 ccm m/2 Zymo-mono-phosphat + 3 ccm Wasser	3 ccm Serum + 3 ccm Wasser	3 ccm m/2 Zymo-mono-phosphat + 3 ccm Serum	Δ (l = 1 dcm)
Zu Beginn . .	+ 1,33°	— 1,80°	— 0,47°	0,00°
Nach 2 Stdn. .	+ 1,33	— 1,80	— 0,46	0,01
„ 4 „ .	+ 1,32	— 1,80	— 0,46	0,02

Tabelle XI.

m/2 glucose-mono-phosphorsaures Natrium (aus Saccharophosphat) + 2 m Natrium-asparaginat. $p_H = 7,0$.

Zeit	3 ccm m/2 Glucose-phosphat + 3 ccm Wasser	3 ccm 2 m Asparaginat + 3 ccm Wasser	3 ccm m/2 Glucose-phosphat + 3 ccm 2 m Asparaginat	Δ (l = 1 dcm)
Zu Beginn . .	+ 0,55°	— 0,68°	+ 0,44°	0,57°
Nach 1 Std. . .	+ 0,53	— 0,66	+ 0,46	0,59
„ 2 „ . .	+ 0,54	— 0,67	+ 0,46	0,59
„ 6 „ . .	+ 0,54	— 0,67	+ 0,45	0,58

Drehungsänderung nach rechts.

Tabelle XIa.

m/2 glucose-mono-phosphorsaures Natrium (aus Saccharophosphat) + 2 m Natrium-asparaginat. $p_H = 7,0$.

Zeit	3 ccm m/2 Glucose-phosphat + 3 ccm Wasser	3 ccm 2 m Asparaginat + 3 ccm Wasser	3 ccm m/2 Glucose-phosphat + 3 ccm 2 m Asparaginat	Δ (l = 1 dcm)
Zu Beginn . .	+ 0,55°	— 0,67°	+ 0,42°	0,54°
Nach 1 Std. . .	+ 0,54	— 0,66	+ 0,44	0,56
„ 4 „ . .	+ 0,54	— 0,66	+ 0,44	0,56

Drehungsänderung nach rechts.



Tabelle XII.

m/2 glucose-mono-phosphorsaures Natrium (aus Saccharophosphat) + 2 m Natrium-glutaminat. $p_H = 7{,}0$.

Zeit	3 ccm m/2 Glucose-phosphat + 3 ccm Wasser	3 ccm 2 m Glut-aminat + 3 ccm Wasser	3 ccm m/2 Glucose-phosphat + 3 ccm 2 m Glutaminat	Δ (l = 1 dcm)
Zu Beginn . .	+ 0,53°	— 0,44°	+ 0,23°	0,14°
Nach 1 Std. . .	+ 0,54	— 0,44	+ 0,24	0,14
„ 2 „ . .	+ 0,55	— 0,43	+ 0,24	0,12
„ 10 „ . .	+ 0,54	— 0,44	+ 0,24	0,14

Drehungsänderung nach rechts.

Tabelle XII a.

m/2 glucose-mono-phosphorsaures Natrium (aus Saccharophosphat) + 2 m Natrium-glutaminat. $p_H = 7{,}0$.

Zeit	3 ccm m/2 Glucose-phosphat + 3 ccm Wasser	3 ccm 2 m Glut-aminat + 3 ccm Wasser	3 ccm m/2 Glucose-phosphat + 3 ccm 2 m Glutaminat	Δ (l = 1 dcm)
Zu Beginn . .	+ 0,52°	— 0,43°	+ 0,21°	0,12°
Nach 2 Stdn. .	+ 0,52	— 0,43	+ 0,22	0,13
„ 4 „ .	+ 0,53	— 0,43	+ 0,22	0,12

Drehungsänderung nach rechts.

Tabelle XIII.

m/2 glucose-mono-phosphorsaures Natrium (aus Saccharophosphat) + 2 m d, l-Alanin. $p_H = 7{,}0$.

Zeit	3 ccm m/2 Glucose-mono-phosphat + 3 ccm Wasser	3 ccm m/2 Glucose-mono-phosphat + 3 ccm 2 m d, l-Alanin	Δ (l = 1 dcm)
Zu Beginn . . .	+ 0,52°	+ 0,52°	0,00°
Nach 2 Std. . .	+ 0,52	+ 0,51	0,01
„ 4 „ . .	+ 0,52	+ 0,51	0,01

Tabelle XIII a.

m/2 glucose-mono-phosphorsaures Natrium (aus Saccharophosphat) + 2 m d, l-Alanin. $p_H = 7{,}0$.

Zeit	3 ccm m/2 Glucose-mono-phosphat + 3 ccm Wasser	3 ccm m/2 Glucose-mono-phosphat + 3 ccm 2 m d, l-Alanin	Δ (l = 1 dcm)
Zu Beginn . . .	+ 0,53°	+ 0,52°	0,01°
Nach 1 Std. . .	+ 0,54	+ 0,53	0,01
„ 20 „ . .	+ 0,54	+ 0,53	0,01

Tabelle XIV.

m/2 glucose-mono-phosphorsaures Natrium (aus Saccharophosphat) + 6 m Harnstoff. $p_H = 7,0$.

Zeit	3 ccm m/2 Glucose-mono-phosphat + 3 ccm Wasser	3 ccm m/2 Glucose-mono-phosphat + 3 ccm 6 m Harnstoff	Δ (l = 1 dcm)
Zu Beginn . . .	+ 0,55°	+ 0,52°	0,03°
Nach 1 Std. . .	+ 0,53	+ 0,51	0,02
„ 2 „ . .	+ 0,54	+ 0,52	0,02
„ 24 „ . .	+ 0,54	+ 0,52	0,02

Drehungsänderung nach links.

Tabelle XIVa.

m/2 glucose-mono-phosphorsaures Natrium (aus Saccharophosphat) + 6 m Harnstoff. $p_H = 7,0$.

Zeit	3 ccm m/2 Glucose-mono-phosphat + 3 ccm Wasser	3 ccm m/2 Glucose-mono-phosphat + 3 ccm 6 m Harnstoff	Δ (l = 1 dcm)
Zu Beginn . . .	+ 0,53°	+ 0,49°	0,04°
Nach 1 Std. . .	+ 0,54	+ 0,50	0,04
„ 4 „ . .	+ 0,54	+ 0,50	0,04

Drehungsänderung nach links.

Tabelle XV.

m/2 glucose-mono-phosphorsaures Natrium (aus Saccharophosphat) + Pferdeserum.

Zeit	3 ccm m/2 Glucose-phosphat + 2 ccm Wasser	3 ccm Serum + 3 ccm Wasser	3 ccm m/2 Glucose-phosphat + 3 ccm Serum	Δ (l = 1 dcm)
Zu Beginn . . .	+ 0,54°	— 1,79°	— 1,24°	0,01°
Nach 1 Std. . .	+ 0,52	— 1,79	— 1,25	0,02
„ 4 „ . .	+ 0,53	— 1,80	— 1,25	0,02
„ 10 „ . .	+ 0,53	— 1,80	— 1,26	0,01

Tabelle XVa.

m/2 glucose-mono-phosphorsaures Natrium (aus Saccharophosphat) + Pferdeserum.

Zeit	3 ccm m/2 Glucose-phosphat + 3 ccm Wasser	3 ccm Serum + 3 ccm Wasser	3 ccm m/2 Glucose-phosphat + 3 ccm Serum	Δ (l = 1 dcm)
Zu Beginn . .	+ 0,53°	— 1,80°	— 1,24°	0,03°
Nach 1 Std. . .	+ 0,53	— 1,81	— 1,24	0,04
„ 2 „ . .	+ 0,53	— 1,80	— 1,23	0,04

Tabelle XVI.

3 m Glucose + Pferdeserum.

Zeit	3 ccm 3m Glucose + 3 ccm Wasser	3 ccm Serum + 3 ccm Wasser	3 ccm 3 m Glucose + 3 ccm Serum	Δ (l = 1 dcm)
Zu Beginn . .	+ 13,67°	— 1,88°	+ 11,90°	0,11°
Nach 2 Std. . .	+ 13,53	— 1,88	+ 11,78	0,13
„ 4 „ . .	+ 13,50	— 1,88	+ 11,74	0,12
„ 20 „ . .	+ 13,51	— 1,88	+ 11,74	0,11

Drehungsänderung nach rechts.

Tabelle XVIa.

3 m Glucose + Pferdeserum.

Zeit	3 ccm 3m Glucose + 3 ccm Wasser	3 ccm Serum + 3 ccm Wasser	3 ccm 3m Glucose + 3 ccm Serum	Δ (l = 1 dcm)
Zu Beginn . .	+ 13,70°	— 1,88°	+ 11,90°	0,08°
Nach 2 Std. . .	+ 13,51	— 1,89	+ 11,73	0,11
„ 4 „ . .	+ 13,51	— 1,88	+ 11,73	0,10
„ 24 „ . .	+ 13,50	— 1,88	+ 11,71	0,09

Drehungsänderung nach rechts.

Tabelle XVII.

3 m Fructose + Pferdeserum.

Zeit	3 ccm 3m Fructose + 3 ccm Wasser	3 ccm Serum + 3 ccm Wasser	3 ccm 3m Fructose + 3 ccm Serum	Δ (l = 1 dcm)
Zu Beginn . .	— 26,34°	— 1,88°	— 28,40°	0,18°
Nach 1 Std. . .	— 26,24	— 1,89	— 28,30	0,17
„ 2 „ . .	— 26,16	— 1,88	— 28,23	0,19
„ 24 „ . .	— 26,18	— 1,88	— 28,26	0,20

Drehungsänderung nach links.

Tabelle XVIIa.

3 m Fructose + Pferdeserum.

Zeit	3 ccm 3m Fructose + 3 ccm Wasser	3 ccm Serum + 3 ccm Wasser	3 ccm 3m Fructose + 3 ccm Serum	Δ (l = 1 dcm)
Zu Beginn . . .	— 26,20°	— 1,88°	— 28,32°	0,24°
Nach 2 Std. . .	— 26,10	— 1,88	— 28,20	0,22
„ 4 „ . .	— 26,09	— 1,89	— 28,21	0,23

Drehungsänderung nach links.

Über die Umwandlung des Methyl-benzoyl-carbinols durch gärende Hefe.

Von

Carl Neuberg und Wassili Komarewsky.

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für Biochemie in Berlin-Dahlem.)

Die *Acyloine* haben eine unerwartete Bedeutung dadurch erlangt, daß sie als Naturerzeugnisse aufgefunden sind und an ihnen die *biosynthetische Kohlenstoff-ketten-verknüpfung* zum ersten Male auf fermentativem Wege verwirklicht worden ist. Wenn beispielsweise Benzaldehyd mit Zymase und Zucker oder Brenztraubensäure zusammentrifft, so entsteht durch *carboligatischen* Aufbau bekanntermaßen eine stark lävogyre Substanz, die formelgemäß aus einem Molekül Bittermandelöl und einem Molekül Acetaldehyd zusammengefügt ist[1]). Wie man sieht, sind zwei Isomere möglich, die als Phenyl-acetyl-carbinol, $C_6H_5 . CHOH . CO . CH_3$, und als Methyl-benzoyl-carbinol, $CH_3 . CHOH . CO . C_6H_5$, zu bezeichnen sind. Nach den Untersuchungen von *C. Neuberg* und *H. Ohle*[2]) kann man durch Grignardierung des carboligatischen Produktes mittels Phenyl-magnesium-bromid zum α-Methyl-α,β-bi-phenyl-äthylen-glykol, $C_6H_5 . CHOH . C(OH)(C_6H_5)(CH_3)$, gelangen, und dieses Glykol wird durch Behandlung mit Schwefelsäure unter Abgabe eines Mol Wasser in Methyl-phenyl-acetophenon übergeführt. Daraus ist der Schluß zu ziehen, daß das Ausgangsmaterial die Konstitution des l-Phenyl-acetyl-carbinols besitzt. Mit absoluter Gewißheit lassen sich jedoch bei dem Vorgange der Grignardierung und der Wasserabspaltung aus dem Glykol Umlagerungen nicht ausschließen, die eine Wanderung der Radikale bedingen. Nun hat *A. Favorsky*[3]) angegeben, daß Hefe überhaupt das Methyl-benzoyl-carbinol zum Phenyl-acetyl-carbinol isomerisiere. Obgleich nach *v. Auwers* eine solche Umgruppierung den Übergang eines Systems mit konjugierten Doppelbindungen in eines mit nichtkonjugierten bedeutet und als

---

[1]) *C. Neuberg* und *J. Hirsch*, diese Zeitschr. **115**, 282, 1921.

[2]) *C. Neuberg* und *H. Ohle*, ebendaselbst **127**, 327, 1922.

[3]) *A. Favorsky*, Bull. Soc. chim. France [4] **39**, 219, 1926.

unwahrscheinlich angesehen wird, und wenn auch bei der Ähnlichkeit, welche die beiden Isomeren naturgemäß aufweisen müssen, die von *Favorsky* bisher mitgeteilten Daten keine völlige Entscheidung zulassen, so haben wir doch im Hinblick auf das Problem der phytochemischen Reduktion sowie das der carboligatischen Synthese das *Verhalten des synthetisch leicht zugänglichen optisch-inaktiven Methyl-benzoyl-carbinols* (*Oxy-propio-phenons*) *zu gärender Hefe* untersucht.

Früher hatten nämlich *C. Neuberg* und *H. Ohle*[1]) bereits Anhaltspunkte dafür gefunden, daß bei der Umwandlung von Benzaldehyd durch gärende Hefe außer dem Phenyl-acetyl-carbinol sekundär auch dessen Reduktionsprodukt, das *α-Methyl-β-phenyl-äthylen-glykol*, auftritt; eine sichere Identifizierung war damals aber nicht möglich gewesen.

Wenn man vom Bittermandelöl ausgeht und von dessen einfacher phytochemischer Reduktion zum Benzylalkohol[2]) absieht, so liegt das Gleichgewicht des biosynthetischen Prozesses sehr zugunsten des Acyloins Phenyl-acetyl-carbinol; nur ein Teil desselben wird zum zugehörigen Glykol reduziert. Das entspricht auch anderen Erfahrungen; so haben vor Jahren *C. Neuberg* und *F. F. Nord*[3]) gezeigt, daß Benzoin phytochemisch kaum angegriffen wird, und neuerdings hat *G. Nagelschmidt* festgestellt, daß die phytochemische Reduktion des Diacetyls zwar schließlich zum 2, 3-Butylen-glykol führt, daß aber die Stufe des Acetoins während dieses biochemischen Prozesses lange persistiert. Ersichtlichermaßen steht nun das Methyl-benzoyl-carbinol ($CH_3 . CHOH . CO . C_6H_5$) seiner chemischen Konstitution nach in der Mitte zwischen dem acyklischen Acetoin ($CH_3 . CHOH . CO . CH_3$) und dem aromatischen Benzoin ($C_6H_5 . CHOH . CO . C_6H_5$), und sein Verhalten bei der phytochemischen Reduktion ist ungefähr so, wie man es für einen Ketonalkohol mit gemischten aliphatischen und ringförmigen Radikalen erwarten darf.

Das Methyl-benzoyl-carbinol wird von gärender Hefe in mittlerer Leichtigkeit zum α-Methyl-β-phenyl-äthylen-glykol reduziert, und zwar erwies sich obergärige Hefe (von *Sinner*) in diesem Falle brauchbarer als Unterhefe (der *Schultheiß-Patzenhofer* Brauerei). Mit letzterer entstand das Glykol; es gelang uns aber hier nicht, den durch sein Reduktionsvermögen gegenüber *Fehling*scher Mischung sich leicht verratenden Ketonalkohol gänzlich zu hydrieren. Die obergärige Hefe bewirkte hingegen diese Umwandlung recht glatt; das Ausgangsmaterial verschwand praktisch vollkommen.

---

[1]) *C. Neuberg* und *H. Ohle*, diese Zeitschr. **128**, 610, 1922.
[2]) *C. Neuberg* und *E. Welde*, ebendaselbst **62**, 477, 1914.
[3]) *C. Neuberg* und *F. F. Nord*, B. **52**, 2251, 1919.

Das gemischte Glykol, $CH_3 . \overset{*}{C}HOH . \overset{*}{C}HOH . C_6H_5$, enthält zwei asymmetrische Zentren. Entsprechend allen bei der phytochemischen Reduktion gemachten Erfahrungen trat auch das *α-Methyl-β-phenyl-äthylen-glykol* in stark aktiver, und zwar *in lävogyrer Form* auf, indem das Methyl-benzoyl-carbinol *asymmetrisch* hydriert wird[1]).

Diese Ergebnisse lehren, daß jedenfalls das Glykol, das zu beiden isomeren Acyloinen gehört, auf phytochemischem Wege gebildet werden kann und bei der Bilanz der biochemischen Umwandlung von Benzaldehyd berücksichtigt werden muß.

Experimentelles.

Das benutzte Methyl-benzoyl-carbinol (Oxy-propio-phenon) wurde nach den Angaben von *K. v. Auwers*[2]) bereitet. Das Ausgangsmaterial bildete das α-Brom-propionyl-bromid, das nach *N. Zelinsky*[3]) gewonnen worden war. Dieses Bromid wurde nach der *Friedel-Crafts*schen Synthese mit reinem Benzol durch Aluminiumchlorid kondensiert. Das entstandene α-Brom-propio-phenon wurde darauf mit essigsaurem Kalium in das Acetat des Methyl-benzoyl-carbinols verwandelt und dieses schließlich zum freien Ketonalkohol verseift.

Versuch 1.

200 g Traubenzucker wurden in 2 Liter Leitungswasser gelöst und mit 200 g Unterhefe versetzt. Nach dem Eintritt lebhafter Gärung wurde tropfenweise eine Lösung von 10 g des Acyloins in 10 ccm Äthylalkohol hinzugefügt. Bei langsamer Zugabe fand keine Unterbrechung der Gärung statt, jedoch erfolgte eine vorübergehende Schwächung der Kohlensäureproduktion. Nach einem Tage war der Zucker verschwunden; denn eine mit Hefe nochmals versetzte kleine Probe des Gärgemisches entwickelte kein Kohlendioxyd mehr, wohl aber auf erneuten Zusatz von Zucker. Das im ursprünglichen Gärgut feststellbare Reduktionsvermögen war also auf noch unverändertes Ketol zu beziehen. Deshalb wurden abermals 100 g Traubenzucker in 200 ccm Wasser und 100 g frische Unterhefe hinzugetan. Diese Behandlung wurde zweimal wiederholt. Trotz völliger Endvergärung des Zuckers hinterblieb noch immer eine siedende *Fehling*sche Lösung schwach reduzierende Flüssigkeit. Dessenungeachtet schritten wir zur Aufarbeitung, die folgendermaßen geschah.

Das filtrierte Gärgut wurde fünfmal mit sehr reichlichen Mengen Äther ausgeschüttelt. Die gesammelten Ätherextrakte wurden vereinigt,

---

[1]) Vgl. hierzu *C. Neuberg* und *E. Simon*, diese Zeitschr. **179**, 443, 1926.
[2]) *K. v. Auwers*, B. **50**, 1177, 1917.
[3]) *N. Zelinsky*, B. **20**, 2026, 1887.

etwa auf 500 ccm konzentriert, über geglühtem Glaubersalz getrocknet und alsdann vollkommen eingeengt. Der Rückstand, ein gelbliches Öl, wurde nunmehr im Vakuum destilliert. Aufgefangen wurden zwei Fraktionen, nämlich eine solche, die zwischen 110 bis 140° und eine solche, die von 141 bis 152° überging. Der erste Anteil wog 2,2 g und der zweite Anteil 5,8 g (Druck 15 mm). Die erste Portion enthielt deutliche Mengen unveränderten Acyloins, die zweite reduzierte *Fehling*sche Mischung in wässeriger Suspension nur mäßig. Wir versuchten aus ihr nach Aufnahme in Äther die Reste anhaftenden Ausgangsmaterials durch Ausschüttelung mit Natriumbisulfit zu entfernen. Dazu verwendeten wir aber die Fraktion zusammen mit einer analogen, die im Versuch 2 abgeschieden worden war.

Versuch 2.

Ein mit 300 g Zucker, 800 g Unterhefe und 10 g Ketonalkohol vorgenommener Ansatz lieferte wiederum zwei Fraktionen. Die Siedepunkte lagen hier günstiger, indem bei 80 bis 120° zuerst 1 g und bei 121 bis 124° dann 5,1 g vollkommen farbloser Substanz gesammelt werden konnten (Druck 0,5 mm). Die höher übergegangene Portion von Versuch 1 wurde mit der von Ansatz 2 vereinigt. Beide reagierten schwach sauer infolge eines Gehalts an Benzoesäure; letztere konnte dem in Äther gelösten Material durch Ausschütteln mit fast gesättigter Sodalösung entzogen werden. Wir versuchten darauf, die in dem Gemisch noch vorhandene Menge Ketonalkohol durch wiederholtes Ausschütteln mit einer 25proz. Lösung von Natriumbisulfit zu entfernen; dies gelang jedoch nur unvollkommen. Nach Waschen der Ätherlösung mit Wasser und abermaliger Behandlung mit verdünnter Sodalösung hinterblieb beim Verdampfen des Äthers ein Öl (3 g), das zwar zur Hauptmenge aus dem Glykol bestand, aber immer noch *Fehling*sche Mischung, wenn auch schwach und nur in der Hitze, reduzierte, während reiner Ketonalkohol schon in der Kälte kräftig auf die alkalische Kupfermischung anspricht.

Versuch 3.

Ein weit besseres Resultat lieferte die Vornahme der phytochemischen Reduktion mit obergäriger Brennereihefe der Firma Sinner.

200 g Rohrzucker in 2 Liter Wasser wurden mit 200 g der obergärigen Hefensorte zur Gärung gebracht und langsam mit einer Lösung von 10 g des gemischten Acyloins in 10 ccm Weingeist versetzt. Nach 24 Stunden war mit der sehr gärtüchtigen Hefe aller Zucker vergoren und auch das Reduktionsvermögen des Ketonalkohols vollkommen verschwunden. Da möglicherweise in der Verdünnung die Reduktionskraft des Methyl-benzoyl-carbinols sich nicht geltend machen würde,

so haben wir zur Sicherheit noch einmal 100 g Saccharose in 500 ccm Wasser und 100 g derselben Oberhefe hinzugefügt.

Am nächsten Tage wurde das zuckerfrei gewordene und filtrierte Gärgut in der zuvor beschriebenen Weise mit Äther ausgeschüttelt. Die analoge Aufarbeitung lieferte nach Vertreibung des Äthers ein dickes Liquidum, das nur ganz spurenhaft auf kochende *Fehling*sche Lösung einwirkte. Die Entfernung von anhaftender Säure wie von Ausgangsmaterial (durch Bisulfit) glückte vollkommen. Wir erhielten 3,3 g des Glykols vom Siedepunkt 118⁰ (1 mm Druck).

Die Analyse zeigte die Reinheit der Substanz an, auch gelang die Oxydation zum intensiv reduzierenden Ketol und dessen Abscheidung als charakteristisches p-Nitro-phenyl-osazon.

Das Glykol war lävogyr:

$$[\alpha]_D = -15{,}15^0$$
$$(\alpha = -15{,}15^0,\ l = 1,\ c = 100).$$

Zum Vergleich haben wir optisch-inaktives α-Methyl-β-phenyl-äthylen-glykol nach der Vorschrift von *Th. Zinke* und *K. Zahn*[1]) bereitet. Das künstlich bereitete Material kristallisiert in zwei Modifikationen. Unsere optisch-aktive Form haben wir zunächst[2]) nicht zur Kristallisation bringen können. Der Siedepunkt beider war jedoch identisch, indem das synthetische Erzeugnis unter gleichen Bedingungen bei 117⁰ sott. Schon öfter ist beobachtet, daß inaktive Form und optisch-aktive Komponenten ungleiche Aggregatzustände besitzen oder verschieden leicht kristallisieren, jedoch praktisch übereinstimmende Siedepunkte aufweisen. Dasselbe Verhalten ist auch hier festzustellen.

0,1417 g Substanz; 0,3666 g CO_2 und 0,1060 g H_2O.

$C_9H_{12}O_2$. Ber.: C = 71,05 Proz.; H = 7,90 Proz.;
gef.: C = 70,56 „ H = 8,31 „ .

Zur *Rückverwandlung in Acyloin* wurde 1,0 g des bio-synthetisierten Methyl-phenyl-äthylen-glykols in bekannter Weise mit 3,0 ccm Salpetersäure von 58 Gewichtsprozent erwärmt, bis heftige Gasentwicklung eintrat; die Reaktion wurde nunmehr bei Zimmertemperatur zu Ende geführt. Das mit Wasser verdünnte Öl reduzierte — im Gegensatz

---

[1]) *Th. Zinke* und *K. Zahn*, Ber. **43**, 849, 1910.

[2]) Nach viermonatiger Aufbewahrung erfolgte partielle Kristallisation des Sirups. Der auf Ton abgezogene und aus Äther plus Ligroin umkristallisierte Teil schmolz unscharf bei 70 bis 73⁰ (Isomeren-gemisch ?). Identifizierung durch Reoxydation zum Acyloin und durch dessen Überführung in das p-Nitrophenylosazon (s. S. 290).

zum Ausgangsmaterial — jetzt *Fehling*sche Mischung stark schon in der Kälte.

Nach Zugabe von 6,0 g Natrium-acetat wurde sodann 3 Stunden lang mit einer alkoholisch-essigsauren Lösung von 4,5 g p-Nitro-phenylhydrazin erhitzt. Die abgeschiedenen rotbraunen Flocken wurden mit verdünnter Essigsäure, Alkohol und Äther gewaschen. Nach dem Umkristallisieren aus einem Gemisch von Nitrobenzol plus Eisessig erhielten wir purpurrote Nadeln vom Schmelzpunkt 263 bis 264^0; sie stellen das p-Nitro-phenylosazon des Methyl-phenyl-acyloins dar, das auch *Neuberg* und *Hirsch* (l. c.) zur Abscheidung des Ketols benutzt hatten.

Zur Kenntnis des Jods als biogenes Element.

IX. Mitteilung:

Über Wachstumsbeschleunigung an jungen Ratten bei Verfütterung jodangereicherter Kost an das laktierende Muttertier.

Von

E. Maurer und St. Diez.

(Aus der Universitäts-Kinderpoliklinik in München.)

(Eingegangen am 22. Dezember 1926.)

Die im Experiment mehrfach festgestellte Tatsache, daß das Schilddrüsensekret und im besonderen sein als Jodothyrin bezeichneter Bestandteil einen Einfluß auf Wachstum und Stoffwechsel auszuüben vermag (*Bircher*, *Magnus-Levy* u. a.), legt den Gedanken nahe, zu prüfen, ob auch dem Jod, dessen Bedeutung für die Wirksamkeit des Schilddrüsenhormons seit *Oswald* bekannt ist, auch allein und für sich imstande sei, einen der Wirksamkeit der Schilddrüse und ihres Sekrets ähnlichen Einfluß zu nehmen.

Versuche nach dieser Richtung sind in den letztvergangenen Jahrzehnten mehrfach unternommen worden. So berichtet *Hildebrand* über Gasstoffwechselversuche an Ratten nach Einverleibung geringer Mengen von Jodkali, welche überraschenderweise eine Herabsetzung des O_2-Verbrauchs der Versuchstiere ergaben. *Grabfield*, *Alpers* und *Prentiss* sahen nach Jodkaligaben von 6 mg pro Kilogramm Körpergewicht eine Erhöhung der Stickstoffausscheidung im Harn und eine Erhöhung des Reststickstoffs im Blute. *Slauk* und *Hanebuth* bestätigen diesen Befund und berichten von einer 20- bzw. 40proz. Steigerung des Reststickstoffs im Blute nach einmaliger hochdosierter Gabe von Jodnatrium bzw. Jodkalium. Auch *Chistoni* sah auf Jodkali eine Steigerung der Stickstoffausfuhr mit erheblicher Vermehrung der Harnsäure- und Purinbasenausscheidung. *Kelly* dagegen berichtet, daß er bei Zugabe kleinster Jodmengen zur Kost junger, wachsender Schweine (25 ccm einer ¼- bis 1proz. Kaliumjodidlösung) eine erhebliche Zunahme der Stickstoff- und Phosphorretention bei annähernd gleichbleibender Calciumretention beobachten konnte. Er nimmt an, daß die Wirksamkeit der Jodzugabe mit der Art der Versuchstiere wechselt und wahrscheinlich von der Beschaffenheit der im Experiment verfütterten Grundkost abhängt. Die Chloridausscheidung durch den Harn nach Jodalkalidarreichung endlich wurde durch *Herzfeld-Gormidor*, sowie durch *Slauk* und *Breier* geprüft und eine Verminderung derselben festgestellt.

Auch der Einfluß von Jodgaben auf das Gewichtswachstum junger Tiere ist mehrfach Gegenstand von Untersuchungen gewesen. An Froschlarven glaubte *Swingle* bei Zufuhr geringer Mengen von Jod eine Be-

schleunigung der Metamorphosen beobachtet zu haben, was allerdings von *Abelin*, *Romeis* u. a. Nachuntersuchern nicht bestätigt werden konnte. *Caneron-Carmichael* sah, daß qualitativ zwar Tyroxin und Schilddrüsensubstanz denselben Effekt bei Verfütterung an wachsende Ratten bezüglich der Größenzunahme innerer Organe hervorruft, daß aber quantitativ, d. h. auf die Basis des Jodgehalts bezogen, die Wirksamkeit des Thyroxins weniger ausgesprochen ist. Ausgehend von der *Kendall*schen Hypothese, daß nur ein Viertel des Schilddrüsenjods in Verbindung mit dem Thyroxin steht, spricht er den Gedanken aus, daß in der Thyreoidea vielleicht noch andere jodhaltige Verbindungen mit ähnlicher Wirksamkeit vorkommen. Beobachtungen an größeren Tieren berichten *Evvard* und *Culbertson*, die in drei Versuchen eine normale (jodarme) und eine mit geringen Mengen von Jodkali versetzte Kost für die Dauer von mehreren Monaten an wachsende Schweine verfütterten. Sie sahen bei jodangereicherter Kost eine 8- bis 13proz. Verbesserung der täglichen Gewichtszunahme und eine im Mittel 10proz. Erhöhung der bei der Schlachtung gewonnenen Fettmengen. Auch der bereits erwähnte Stoffwechselversuch von *Kelly* ergab, daß die mit jodreicher Kost gefütterten Schweine eine mittlere Zunahme des Lebendgewichts um immerhin 3 Proz. aufwiesen. In gleichem Sinne lautet ein Bericht aus dem Staffordsire-Farm-Institut, Ontario, in welchem von einer 7proz. Steigerung der Gewichtszunahme junger Schweine bei Zufütterung geringer Jodkalimengen die Rede ist.

Eigene Versuche, von denen im folgenden berichtet werden soll, sind gedacht als erster Teil einer größeren Reihe von Arbeiten, welche Klarheit darüber geben sollen, ob durch Jodanreicherung der Kost des Muttertieres sich ein Einfluß auf die Entwicklung des Nachwuchses erzielen läßt. Im vorliegenden Falle ging die Absicht dahin, zu prüfen, ob und in welchem Sinne das Gedeihen und der Stoffwechsel des säugenden Muttertieres und der Jungen auf solche Art zu beeinflussen sind. Zur Durchführung der Versuche wurde an weiße Mutterratten von gleicher Herkunft und annähernd gleichem Gewicht, welche sämtlich während der Tragezeit gleichmäßig mit Küchenabfällen gefüttert worden waren, eine Kost aus Milch und Mais verabreicht, die sich für die Versuchs- und Normaltiere nur insofern voneinander unterschied, als die Kost der Jodtiere auf dem Wege einer Pflanzen- bzw. Tierpassage mit Jod angereichert war. Der Mais war auf einem Boden gezogen, dessen Düngung mit einem Zusatz von 0,2 bis 0,3 Gewichtsprozent Jodkalium erfolgte. Die an die Versuchstiere verfütterte Milch stammte von Kühen, welche für längere Zeitdauer ein tägliche Zulage von 4 mg Jod als Kaliumjodid erhielten. Der Jodgehalt des Maises stieg unter dieser Methode von 3,5 γ-Proz. der Norm auf rund 10 γ-Proz., mithin etwa auf das Dreifache. Der Jodgehalt der Milch veränderte sich von 3,5 γ in 100 ccm auf 7 γ und stieg damit annähernd auf das Doppelte der Norm, während die Beschaffenheit annähernd unverändert blieb[1]).

[1]) Vergleiche andere Arbeiten dieser Veröffentlichungsreihe.



Bei Zugrundelegung eines mittleren Kostsatzes von 20 ccm Milch und 20 g Mais für Tag und Tier berechnet sich die Menge des mit Normalkost zugeführten Jods im Tage auf rund 2 γ, bei Versuchskost auf rund 4 γ. Die Haltung der Tiere erfolgte stets gleichmäßig in geräumigen Holzkäfigen, deren Boden mit einer öfters gewechselten Torfmullschicht bedeckt war.

Im ersten Teile des Versuchs wurde durch tägliche Feststellung des Gewichts der Jungtiere die Wachstumskurve für die Dauer der Stillperiode (21 Tage) bestimmt und auch auf Gewichtsveränderungen des Muttertieres geachtet. Es ergab sich dabei, daß bei fast völlig gleichbleibendem Gewicht der Muttertiere zu Anfang und zu Ende der Lactation diejenigen Jungtiere, deren Mütter eine jodreiche Nahrung erhielten (J 1 bis J 4), wesentlich besseres Wachstum zeigten als die Kontrollen (N 1 bis N 4).

Tabelle I.

Gewichte der Jungratten (in $^1/_{10}$ g).

Tag der Geburt .	13. XII.	9. II.	26. I.	6. III.	4. III.	8. III.	—	27. I.	8. III.	26. II.	8. III.	—
Zahl der Jungen .	5	12	7	10	8	8	8	6	7	9	8	8
Gew. der Mutter am Anf.	120	150	150	170	150	150	150	150	150	170	120	150
Gew. der Mutter am Ende	120	160	140	170	150	150	150	150	150	170	130	150
Nr. des Tieres .	N 1	N 2	N 3	N 4	N 5*)	N 6*)	Mittelwert	J 1	J 2	J 3	J 4	Mittelwert
Lactationstag												
1.	50	40	50	45	45	45	45	50	50	45	40	45
2.	55	45	55	45	45	50	50	55	60	50	55	55
3.	60	45	70	45	50	50	55	60	65	60	55	60
4.	75	55	65	50	55	60	60	65	75	70	60	65
5.	80	60	80	55	60	65	65	75	85	80	70	80
6.	95	70	90	55	65	65	75	90	100	90	80	90
7.	105	85	95	60	70	70	80	120	110	95	90	105
8.	110	90	105	60	75	85	90	135	120	105	100	115
9.	120	100	110	65	80	90	95	145	135	115	105	125
10.	120	105	120	65	95	100	100	160	145	120	120	135
11.	130	115	130	70	100	110	110	165	150	130	125	140
12.	135	135	130	80	105	130	120	175	160	135	130	150
13.	140	145	135	90	110	140	125	175	170	145	150	160
14.	155	155	140	105	115	155	140	180	175	150	155	170
15.	165	155	150	110	125	165	145	190	185	165	160	175
16.	170	160	155	115	145	170	150	200	190	170	170	180
17.	175	160	160	125	160	170	160	210	210	180	185	195
18.	175	165	160	140	170	185	165	220	220	190	195	205
19.	180	185	165	160	180	190	175	230	230	190	200	210
20.	185	190	165	170	190	195	185	235	245	190	210	220
21.	185	210	165	185	195	210	190	240	265	200	220	230

*) Tägliche Zulage von 20 γ Kaliumjodid.

Im Mittelwerte überragt somit das Gewicht der Jungtiere aus den Versuchsstämmen zu Ende der ersten Lebenswoche um 10 Proz., zu Ende der zweiten Lebenswoche und von da ab bis zum Ende der Lactation um 20 Proz. die entsprechende Norm. Ein zweiter Kontrollversuch, auf den an dieser Stelle nur kurz hingewiesen werden soll, wurde mit Zugabe von

täglich 20 γ Jod als Kaliumjodid zur Normalkost durchgeführt (N 5, N 6). Da sich dabei keine den Wirkungen der Versuchskost entsprechende Veränderung des Gewichtswachstums der Jungtiere ergab, wurde er nach einmaliger Wiederholung zurückgestellt und vorläufig nicht zu der später zu besprechenden chemisch-analytischen Prüfung herangezogen.

Die Menge der uns vorläufig zum Versuch verfügbaren Futtermittel war gering, so daß wir uns mit der Prüfung der Wachstumskurven an sechs Normalstämmen und vier Versuchsstämmen begnügen mußten. Um so mehr schien es angebracht, die Grundlagen dieses unterschiedlichen Verhaltens durch möglichst eingehende Auswertung der Ergebnisse zu überprüfen. Zu diesem Zwecke wurde ein Teil der Jungtiere nach Abschluß der Saugperiode bezüglich der Gewichtszunahme weiterhin beobachtet.

Tabelle II.

Gewichte der Jungratten in vierter bis sechster Lebenswoche (in $^1/_{10}$ g).

Lebenstag	Normalkost		Jodkost		
	N 2	N 3	J 1	J 3	J 4
21.	210	165	240	200	220
28.	285	285	330	320	265
35.	440	445	480	460	360
42.	540	550	570	550	520

Es zeigt sich, daß alsbald nach der Abstillung, d. h. rund eine Woche nach Beginn der Fütterung mit gemischter Normalkost (Küchenabfälle), die Jodtiere nur mehr ein Übergewicht von 10 Proz., nach weiteren 8 Tagen aber bereits wieder ein den gleichalterigen Normaltieren entsprechendes Gewicht hatten und nun diesen gleichartig weiter zunahmen.

Von den Versuchs- und Kontrolltieren wurden je zwei weitere Sätze, bestehend aus der Mutterratte und drei gleichgewichtigen Jungratten, am 21. Tage post partum getötet und auf dem Wege der chemischen Analyse geprüft.

Die Technik der Untersuchungen gestaltete sich wie folgt:

Die Ratten wurden unmittelbar nach dem Tode nochmals gewogen, von anhaftenden Unreinlichkeiten befreit und bis zur Untersuchung in jodfreiem Alk. abs. aufbewahrt. Zur Vorbereitung der Analyse wurde jedes Tier zuerst manuell zerkleinert, dann durch einen Fleischwolf getrieben und dieser mit jodfreiem, heißem Aqua dest. quantitativ nachgespült. Der erhaltene Brei wurde auf dem Wasserbad zur Trockne eingedampft, die getrocknete Masse mehrmals im Mörser zerrieben. Als Übelstand ergab sich dabei, daß die Haare beim Reiben verfilzten und so die Homogenität der Trockensubstanz beeinflußten. Auch gelang es nicht immer, die Knochenteile so vollkommen zu zerkleinern, daß sie gleichmäßig durch die ganze Substanz verteilt waren. Bestimmungen von Aschen-, Phosphor- und Calciumgehalt, die aus den aliquoten Teilen der Trockensubstanz ausgeführt wurden, zeigten aus diesem Grunde bei der Wiederholung nicht unwesentliche Abweichungen. In die Tabellen mußte daher ein Mittelwert eingesetzt werden, der sich aus den Ergebnissen mehrfach wiederholter Untersuchungen errechnete. Zur Herstellung der *Trockensubstanz* wird die gesamte Menge der durch Zermahlen gewonnenen Organe



bei 103 bis 105° C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Die Trockenmasse war stark hygroskopisch, so daß die Entnahmen für die verschiedenen Bestimmungen mit Differenzwägung des Wägegläschens vorgenommen werden mußte. Die *Veraschung* erfolgt im gewichtskonstanten Porzellantiegel unter Anwendung geringer Hitze und unter mehrfachem Durchfeuchten mit destilliertem Wasser. *Ca-Bestimmung*: Die von Silikaten befreite Asche wird mit Salzsäure gelöst, zur Abscheidung der Phosphorsäure mit Ammoniak neutralisiert, Ferrichlorid und Natriumacetat bis zur Rotfärbung zugegeben, aufgekocht und heiß rasch filtriert. Der Niederschlag von Ferriphosphat und basischem Acetat wird mit heißem, ammonacetathaltigem Wasser ausgewaschen (Filtrat I). Der Niederschlag wird nochmals gelöst, neutralisiert und mit Essigsäure angesäuert, dann mit gesättigter Ammoniumacetatlösung versetzt, aufgekocht, filtriert und wie oben mit ausgewaschen (Filtrat II). Filtrat I + Filtrat II + Ammoniumchlorid mit überschüssigem Natriumacetat versetzt, wird zum Sieden erhitzt, zur siedenden Lösung heiße gesättigte Ammoniumoxalatlösung zugegeben. Es scheidet sich Calciumoxalat aus, das man absitzen läßt. Der Niederschlag von Calciumoxalat wird mit ammoniakalischem Wasser ausgewaschen, mit heißer verdünnter Schwefelsäure versetzt und die schwefelsaure Lösung auf 80 bis 90° erhitzt. Titration in der Hitze mit einer n/10 $KMnO_4$-Lösung, bis der letzte Tropfen nicht mehr entfärbt wird. *Phosphorbestimmung* (nach *Neumann-Gregersen*): Zur Veraschung gibt man in einen Rundkolben mit der abgewogenen Substanz zunächst 5 bis 10 ccm Säuregemisch (gleiche Teile konzentrierter H_2SO_4 und konzentrierter HNO_3 von spezifischen Gewicht 1,4) und erhitzt sehr langsam. Wenn keine roten Dämpfe mehr aufsteigen, läßt man aus einem Tropftrichter noch weiterhin Säuregemisch langsam zutreten (20 Tropfen in der Minute). Die Zerstörung der organischen Stoffe ist beendet, wenn nach Vertreiben der rotbraunen Dämpfe durch stärkeres Erhitzen die Flüssigkeit nicht mehr nachdunkelt, sondern klar und farblos (hellgelb) bleibt. Es sollen nicht mehr als 20 ccm Säuregemisch verbraucht werden. Nun gibt man 140 ccm Wasser zu, erhitzt und hält die Flüssigkeit etwa 10 Minuten im Sieden. Dabei werden die durch Zersetzung der Nitrosylschwefelsäure sich bildenden braunen Stickoxyde ausgetrieben. Zur Phosphorbestimmung wird der Niederschlag abfiltriert, mit 1 proz. Kaliumnitratlösung bis zum Verschwinden der sauren Reaktion ausgewaschen und samt dem Filter in den Kolben zurückgebracht, in dem die Fällung vorgenommen wurde. Hierauf versetzt man unter Umrühren mit n/10 Natronlauge, bis der Niederschlag in Lösung gegangen ist, gibt Phenolphthalein zu und titriert den Überschuß mit n/10 Salzsäure bis zum Umschlagspunkt zurück. Die *Jodbestimmungen* wurden nach der Mikromethode von *Fellenberg* vorgenommen. Die Untersuchungen ergaben die Werte in Tabelle III.

Der bei den Normal*jungtieren* nur innerhalb enger Grenzen (21 bis 25 Proz.) schwankende Anteil der *Trockensubstanz* am Gesamtgewicht findet sich bei den Jungtieren der Versuchsreihen mit 27 bis 30 Proz. bzw. 31 bis 33 Proz. sehr wesentlich, im Mittelwert um ein Drittel der Norm, vermehrt. Noch klarer tritt diese Tatsache in Erscheinung, wenn man in Betracht zieht, daß nach dem früher Gesagten ja auch schon das Lebendgewicht der Versuchsjungtiere am Tage der Tötung um rund 25 Proz. höher war als das der Normaljungtiere. Der Rest der Trockensubstanzerhöhung erweist sich als bedingt durch die Verminderung des Wasser-

Tabelle III.

Ratte	Lebendgewicht g	Trockensubstanz Gewicht g	Trockensubstanz Proz. des Lebendgewichts	Aschengehalt Gewicht g	Aschengehalt Prom. des Lebendgewichts	Aschengehalt Proz. der Trockensubstanz
Normalsatz 1						
Muttertier . .	120.0	23,6058	19.7	3,093	26	13.1
Jungtier 1 . .	18.5	4,3241	23.3	0,757	41	17.5
„ 2 . .	18.5	4,1680	22.5	0.753	41	18.1
„ 3 . .	18.5	4,5827	24.8	—	—	—
Normalsatz 2						
Muttertier . .	160,0	24.7940	15.5	4.480	28	18.0
Jungtier 1 . .	21.0	4.7352	22.5	0.952	45	20.0
„ 2 . .	21.0	4.3385	20.7	0.856	41	19.7
„ 3 . .	21.0	4 3836	20.9	—	—	—
Versuchssatz 1						
Muttertier . .	150.0	36.3702	24.2	4.583	31	12.6
Jungtier 1 . .	24.0	6,4200	26.8	0.924	39	14.4
„ 2 . .	24.0	7,0438	29.3	1.051	44	14.9
„ 3 . .	24.0	6.4586	26.9	—	—	—
Versuchssatz 2						
Muttertier . .	150.0	38.1108	25.4	3.056	20	8.1
Jungtier 1 . .	26.5	8,7791	33.1	1.657	62	18.9
„ 2 . .	26.5	8,2180	31.0	1.609	61	19.6
„ 3 . .	26.5	8.3677	31.6	—	—	—

gehalts und einen Ersatz desselben durch feste Substanz innerhalb der an sich bereits erhöhten Gesamtmasse des Körpers. Überraschenderweise dehnt sich der Vorgang einer Trockensubstanzvermehrung auch auf die im Gewicht und Aussehen unverändert gebliebenen *Muttertiere* der Versuchsreihe aus. Diese stammten, wie bereits hervorgehoben wurde, aus dem gleichen Zuchtkreis und waren in der Vorperiode und bis auf die Jodanreicherung der Kost auch in der Versuchsperiode mit einer ebenso zusammengesetzten Nahrung gefüttert wie die Muttertiere der Kontrollreihen. Trotzdem zeigte es sich, daß nach der Tötung am 21. Lactationstage die Normalmuttertiere 20 bzw. 16 Proz. ihres Gewichts an Trockensubstanz enthielten, die Versuchsmuttertiere aber 24 bzw. 25 Proz. Die mittlere Zunahme der Trockensubstanz am Muttertier mit 40 Proz. entspricht weitgehend derjenigen am Jungtier mit 35 Proz. des Normalwertes.

Auch in der Menge des *Aschengehalts* sind bei den *Jungtieren* Unterschiede für die beiden Kostarten klar erkennbar. Dies geht schon aus dem Vergleich der entsprechenden Gewichtsmengen hervor: Der Körper der Normaljungtiere enthält 0,75 bis 0,95 g, derjenige der Versuchsjungtiere aber 0,92 bis 1,66 g Aschenbestandteile. Immerhin bleibt der Aschengehalt in seiner Zunahme gegenüber dem Trockensubstanzgehalt wesentlich zurück, da sich unter der Versuchskost ersterer nur um 25 Proz., letzterer aber um 35 Proz. vom Mittelwert der Norm entfernt. Es ist auffallend, daß die beiden zur chemischen Analyse verwendeten Sätze von Versuchstieren hier durchaus nicht in völlig gleicher Weise von den sehr gut übereinstimmenden Werten der beiden Normaltiersätze abweichen: Es zeigt sich bei den Jungtieren der Versuchsreihe 2 eine wesentlich stärkere Zunahme des Trockensubstanzanteils, welcher auch eine ebenso große Vermehrung

des Aschenanteils am Lebendgewicht entspricht. Bei den Jungtieren der Versuchsreihe 1 dagegen ist die Zunahme des Trockensubstanzanteils verhältnismäßig gering. Eine absolute Vermehrung des Aschenanteils tritt überhaupt nicht in Erscheinung, so daß der Aschenanteil an der Trockensubstanz sogar um 25 Proz. geringer ist als der Norm entspricht. Eigenartig ergänzt wird diese Beobachtung dadurch, daß die erwähnte Anreicherung des Mineralgehalts in den Jungtieren der Versuchsreihe 2 begleitet ist von einer Verarmung des zugehörigen *Muttertieres* an den gleichen Substanzen. Die Zunahme bei den Jungtieren kann allerdings nicht allein erklärt werden als Folge einer stärkeren Ausschwemmung der Minerale aus dem mütterlichen Körper mit der Milch, da der absolute Verlust beim Muttertiere rund 1,5 g, die Zunahme bei den sieben Jungtieren dieses Wurfes aber insgesamt 4 g beträgt. Das Muttertier der Versuchsreihe 1, in der auch die Jungtiere einen der Norm entsprechenden Aschenanteil am Gewicht aufweisen, zeigt im Gegensatz zu dem vorgenannten keine Änderung der Verhältnisse gegenüber den entsprechenden Kontrolluntersuchungen.

Von den Einzelbestandteilen der Körperasche wurde im Laufe der hier beschriebenen Untersuchungsreihe der Gehalt an Calcium, Phosphor und Jod einer quantitativen Prüfung unterzogen. Bezüglich des Calciumgehalts in den *Jungtieren* der Versuchsreihen ergibt sich ein Gleichbleiben des Anteils an dem an sich ja gesteigerten Körpergewicht, dagegen ein Zurückbleiben im Verhältnis zur Trockensubstanz. Es kommt dieser Unterschied deutlich zum Ausdruck bei der Betrachtung des Ca-Anteils an der Gesamtasche in Versuchsreihe 2, wo durch eine im absoluten Wert zwar erhebliche, im Vergleich mit der Steigerung des Lebendgewichts und der Gesamtasche aber geringergradige Zunahme des Ca-Gehalts eine Abminderung des Prozentwerts sich ergibt. Bei den *Muttertieren* der Versuchsreihen findet sich in beiden Fällen ein umfangreiches Defizit, welches insbesondere im Falle der Versuchsreihe 2 die starke Abnahme des gesamten Aschengehalts noch um etwa weitere 40 Proz. übertrifft.

Der *Phosphor*anteil am Organismus der *Jungtiere* aus den Versuchsreihen liegt, bezogen auf das Lebendgewicht der Tiere, nur wenig über den Werten der Norm. Insbesondere zeigt sich, daß auch der P-Gehalt im großen und ganzen nur entsprechend dem Lebendgewicht zunimmt, im Vergleich zur Gesamtasche in Versuchsreihe 2 aber, ebenso wie Ca, sogar um Erhebliches gegenüber der Norm abnimmt. Für Versuchsreihe 1 ergibt sich hier ein gleiches wie früher bezüglich der Gesamtasche für Versuchsreihe 2 hervorgehoben: eine relative Steigerung des Wertes in den Jungtieren ist begleitet von einer relativen Senkung des Wertes beim Muttertier.

Im *Jod*gehalt der Versuchstiere zeigt sich keine Erhöhung der Werte, obwohl die Kost jodreicher und nach mehrfach vorgenommenen Fütterungsversuchen an Kühen und Ziegen damit auch eine Jodanreicherung der Milch zu erwarten war. Es ergab sich im Gegenteil ein Joddefizit, indem der Jodgehalt im Gesamtorganismus für die Jungtiere etwa um die Hälfte, für die Muttertiere sogar noch stärker gegenüber der Norm gesenkt erscheint.

Die im vorstehenden mitgeteilten Beobachtungen sind an Zahl und Ausdehnung noch zu gering, um eine Klärung der Frage nach der Bedeutung des Jods im Körperhaushalt zu bringen. Ihr Wert liegt in dem Hinweis darauf, daß offenbar das Jod trotz oder vielleicht

Tabelle IV.

Ratte	Calciumgehalt				Phosphorgehalt				Jodgehalt		
	Gewicht g	in Prom. des Lebendgewichts	in Proz. der Trockensubstanz	in Proz. der Asche	Gewicht g	in Prom. des Lebendgewichts	in Proz. der Trockensubstanz	in Proz. der Asche	Gewicht γ	in γ-Proz. des Lebendgewichts	in γ-Proz. der Trockensubstanz
Normalsatz 1											
Muttertier . .	1,425	11,9	6,1	46,7	0,604	5,0	2,6	19,5	—	—	—
Jungtier 1 . .	0.152	8,0	3,5	19,9	0 079	4,0	1,8	10,3	—	—	—
„ 2 . .	0.158	8,1	3.4	21,0	0,075	4.0	1,8	10,9	—	—	—
„ 3 . .	—	—	—	—	—	—	—	—	3,0	17,0	70,0
Normalsatz 2											
Muttertier . .	1.650	10,3	6,7	37.0	0,615	3,8	2,6	14.5	45.0	28,0	180.0
Jungtier 1 . .	0.181	8,6	3,8	18.9	0.103	4 8	2,2	10,8	—	—	—
„ 2 . .	0.158	7,5	3,7	18.5	0,086	4,1	2,0	10.0	—	—	—
„ 3 . .	—	—	—	—	—	—	—	—	2,8	13.0	65,0
Versuchssatz 1											
Muttertier . .	0,980	6,5	2,7	21,4	0.386	2,6	1,3	10,8	11.0	7,4	30,0
Jungtier 1 . .	0.166	6.9	2,6	18,0	0.122	5,1	1,9	13.2	—	—	—
„ 2 . .	0.186	7,7	2,5	18,5	0.137	5,7	1,9	13,1	—	—	—
„ 3 . .	—	—	—	—	—	—	—	—	1,7	7,1	26,6
Versuchssatz 2											
Muttertier . .	0,799	5.3	2,1	25,9	0,569	3,8	1,5	18,5	12,3	8,3	32,5
Jungtier 1 . .	0,222	8.4	2,7	14 3	0.123	4,6	1,4	7,4	—	—	—
„ 2 . .	0,246	9,3	3,0	15,3	0,134	5,0	1,6	8.3	—	—	—
„ 3 . .	—	—	—	—	—	—	—	—	2,0	7,6	23,5

gerade nach Passage durch einen pflanzlichen bzw. tierischen Organismus in der Lage ist, wesentlichen Einfluß auf Wachstum und Stoffwechsel zu nehmen.

Die *Schlüsse*, welche aus der *Zusammenfassung* der Ergebnisse des berichteten Experiments gezogen werden dürfen, bestehen vorerst in Folgendem:

1. Bei Verfütterung einer auf dem Wege der Joddüngung des Ackerbodens und Jodzufütterung zu Milchkühen jodangereicherten Kost aus Mais und Milch an säugende Ratten für die Dauer der Lactation bleibt das Lebendgewicht und das allgemeine Verhalten der Muttertiere unbeeinflußt, das Gewicht der Jungtiere dagegen ist am Ende der dreiwöchigen Lactationsdauer um im Mittel 20 Proz. gegenüber der Norm erhöht. Ein rasches Schwinden des Gewichtsüberschusses nach Verfütterung einer normalen Nahrung an die abgestillten Jungtiere der Versuchsreihen weist mit Wahrscheinlichkeit darauf hin, daß die Zeitdauer der Wirksamkeit der „Jodkost“ mit der Zeitdauer ihrer Verfütterung übereinstimmt.

2. Der *Trockensubstanzgehalt* der jodreich ernährten Muttertiere und ihrer Jungen hat unter der Versuchskost eine Anreicherung erfahren, welche das Maß der durchschnittlichen Erhöhung des Lebendgewichts wesentlich überschreitet.

3. Der *Aschengehalt* beteiligt sich bei den Muttertieren im Versuch nicht an der starken Zunahme des Trockensubstanzgehalts, ja es ergibt sich in einem der beiden Fälle sogar ein absoluter Verlust an Salzen, bei den Jungtieren dagegen findet sich in der gleichen Versuchsreihe eine auffallend starke Erhöhung des Aschenanteils am Lebendgewicht.

4. Der *Calciumgehalt* im Körper der Muttertiere ist unter der Versuchskost sehr erheblich, und zwar in stärkerem Grade als der Gesamtaschengehalt gesenkt, bei den Jungtieren beteiligt sich das Calcium nicht an der Zunahme des Gesamtaschengehalts in der unter Punkt 3 besonders erwähnten Versuchsreihe.

5. Auch beim *Phosphor* macht sich eine den Verhältnissen beim Ca entsprechende Bilanzstörung unter der Versuchskost in Gestalt einer Senkung der entsprechenden Werte beim Muttertier geltend. Für die Jungtiere gilt das gleiche wie oben für Ca beschrieben.

6. Der Unterschied zwischen dem Verhalten der Gesamtasche und ihrer beiden Komponenten Ca und P läßt darauf schließen, daß offenbar *andere Aschenbestandteile* dafür eine um so größere Mengenvermehrung unter der Versuchskost erfahren. Weitere Untersuchungen gerade in dieser Richtung scheinen von Wichtigkeit.



7. Der *Jodgehalt* der jodreich gefütterten Versuchstiere erscheint bei Mutter- und Jungtieren um die Hälfte und mehr gegenüber der Norm gesenkt, was darauf schließen läßt, daß erhöhte Jodzufuhr auch den Stoffwechsel des Jods im Sinne einer Steigerung beeinflußt.

Literatur.

Abelin, diese Zeitschr. **116**, 138, 1921. — *Bircher*, Würzburger Abhandl. XXII. — *Cameron-Carmichael*, Journ. of biol. chem. **45** und **46**. — *Chistoni*, Arch. ital. de biol. — *Evvard* und *Culbertson*, Research Bull. **86**, Ames-Jowa 1925. — *Grabfield-Alpers-Prentis*, Journ. of pharm. a. exper. therap. **22**. — *Herzfeld-Gormidor*, Dissertation Zürich 1912. — *Hildebrand*, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **96**. — *Kelly*, Biochem. Journ. **19**, 4. — *Maurer*, Arch. f. Gyn. 1927; Zeitschr. f. Kinderheilkunde 1927. — *Maurer* und *Diez*, diese Zeitschr. **178**, 161, 1926. — *Magnus-Levy*, Zeitschr. f. klin. Med. **83**, 52, 60. — *Orr*, Adress to Sekt. M. Brit. assoc., Southampton 1925. — *Oswald*, Zeitschr. f. phys. Chem. **23**. — *Swingle*, Biol. bull. of Marine biol. labor. **45**, zitiert nach *Slauk*.

Über die Bedeutung von Eisen, Zink und Kupfer für Mikroorganismen.

(Unter besonderer Berücksichtigung von Aspergillus niger.)

Von

Hermann Bortels.

(Aus dem Institut für landwirtschaftliche Bakteriologie der Universität Göttingen.)

(Eingegangen am 6. Dezember 1926.)

Mit 2 Abbildungen im Text.

Inhalt.

I. Einleitung.

Eusèbe Gris war es, der 1845 die Entdeckung machte, daß chlorotische Pflanzen mit Eisen geheilt werden können. Einige Jahre später behauptete dann *Raulin*, daß Eisen für das Wachstum des Aspergillus niger unbedingt notwendig sei. Den exakten Beweis für seine Behauptung blieb er schuldig. Hieraus ergibt sich das Für und Wider späterer Untersuchungen über die Lebensnotwendigkeit des Eisens. *Cugini*, *Schulz* und *Mayer* bestritten die Ansicht *Raulins*. *Molisch* aber nahm auf Grund eingehender Untersuchungen abermals an, daß Eisen für Aspergillus unentbehrlich sei, konnte es aber auch nicht völlig beweisen. Mit dieser Arbeit war denn auch der Streit noch nicht entschieden. *Wehmer* (2) wandte sich sogar energisch gegen die Anschauung *Molischs*. Er hielt Eisen für völlig entbehrlich, während *Benecke* eine teilweise Vertretbarkeit dieses Metalls durch Zink vermutete. Die Beziehungen des Eisens zu Sporenbildung und Sporenfarbstoff untersuchten *Linossier*, *Javillier-Sauton* und *Sauton* (1) (2). *Sauton* (1) hat auch schon auf die Möglichkeit einer atmungskatalytischen Rolle des Eisens hingewiesen. *Lappalainen* und *Ruhland* haben die große Bedeutung des Eisens für Aspergillus bzw. Knallgasbakterien wieder betont, und die biochemischen Versuche *Warburgs* (1) (2) (3) über die Atmung und von *Yabusoe* lassen kaum noch einen Zweifel an der physiologischen Notwendig-

keit des Eisens aufkommen. Sehr bemerkenswert in dieser Beziehung ist die Veröffentlichung von *Baudisch* über eine anorganische labile Eisenverbindung, das sogenannte „Aquosalz“, das in künstlichen Nährböden gewisser pathogener Bakterien sogar das Blut ersetzen soll. Eine neueste Arbeit von *Fresenius* und *Harpuder* ergab allerdings die Entbehrlichkeit dieser Annahme eines besonderen Salzes, da einfache Mischungen von Eisensalz und Bicarbonat dieselbe Wirkung haben wie das angenommene „Aquosalz“ der natürlichen Mineralquellen. Weitere Arbeiten über das Eisen brachten nichts Neues von Bedeutung. Niemand konnte den vollen Beweis für die Notwendigkeit erbringen.

Meine Versuche beweisen, daß Eisen mindestens für das Wachstum des Aspergillus niger unbedingt notwendig ist.

Die wichtige Rolle des Zinks bei der Vegetation haben vor allem *Raulin* und *Javillier* (1) (2) erkannt, die es ebenfalls für lebensnotwendig erklärten, ohne auch hierfür den vollen Beweis erbringen zu können. Nach *Kosinski* steigert Zinksulfat die Atmung, nach *Richards* auch das Wachstum. Später hat dann auch *Lappalainen* wieder auf die stark fördernde Wirkung des Zinks auf das Wachstum des Aspergillus hingewiesen. Im übrigen ist in der Literatur das Zink immer wieder als „Reizstoff“ (*Richter*, *Buromsky*) oder gar als Gift (*Richter*, *Iwanoff*, *Arcichowskij*) angeführt. *Lepierre* behauptete, Zink könne durch Cadmium ersetzt werden, was ich jedoch nicht bestätigen konnte. Auffallend ist die Bildung einer Zinkverbindung aus Chlorophyll nach *Willstätter-Pfannenstiel*. Wenn die Mikrobiologen heute das Zink allgemein als „Reizstoff“ betrachten — eine Bezeichnung für Stoffe, deren physiologische Wirkungen noch völlig ungeklärt sind —, so liegt das wahrscheinlich daran, daß sie die außerordentlich geringen Konzentrationen, in denen das Zink als katalytisches Element wirkt, nicht genügend berücksichtigt haben. Es ist klar, daß alle Stoffe in Konzentrationen, die weit über dem Maximum ihrer Wirkung liegen, mehr oder wenig giftig sein müssen. Wichtiges Material zur Erkennung der physiologischen Rolle des Zinks haben Tierphysiologen und Mediziner beigebracht. Ich nenne hier *Bodansky*, *Weitzel*, *Birckner*, *Cristol* und *Rost*, die das Vorkommen des Zinks in den einzelnen Organen und seine vielleicht bestehenden Beziehungen zum Eiweißstoffwechsel und zum Wachstum ermittelten. Ganz besonders bemerkenswert sind auch die Arbeiten *Bertrands* (1) (2), nach denen Zink vornehmlich in den Sexualorganen gefunden wurde, und es möglich sein soll, daß es bei Mäusen Vitamin ersetzen kann.

Meine Versuche ergaben, daß auch Zink mindestens für Aspergillus niger lebensnotwendig ist.

Während das Kupfer im tierischen Organismus ganz allgemein erst in relativ sehr hohen Konzentrationen giftig wird, hat man es als eins der heftigsten Gifte für Bakterien, Algen und Pilze bezeichnet („oligodynamische Wirkung“ *Nägelis*). Schon *Raulin* nahm an, daß neben Eisen und Zink wahrscheinlich noch mehr Elemente für Aspergillus notwendig seien. Kupfer aber bezeichnete er als Gift. Das taten auch andere Forscher, die sich später damit befaßten (*Richter* und *Iwanoff*). *Ono* wandte sich jedoch gegen die Ansicht *Richters*, daß Kupfer nur Gift sei. Er erzielte mit sehr niedrigen Konzentrationen bei Aspergillus eine „Reizwirkung“, d. h. eine ganz ansehnliche Steigerung des Erntegewichts. Dasselbe, was ich über die „Reizstoffnatur“ des Zinks gesagt habe, gilt auch für Kupfer. *White* und *Bodansky* schrieben dem Kupfer eine besondere physiologische Rolle

zu[1]). Über den Mechanismus der Oxydation durch Kupferkatalyse hat *Wieland* ausführlich berichtet. Neuerdings, nachdem ich meine Versuche bereits beendet hatte, wurden *Wertheimers* lehrreiche Modellversuche mit Kupfer veröffentlicht. Er fand, daß die Autoxydation von Phenylendiamin – α-Naphthol zum Farbstoff Indolphenolblau durch Kupferkatalyse verursacht wird. Eisen war in diesem Falle völlig unwirksam. Verfasser vermutet, daß die katalytisch oxydative Wirkung des Kupfers möglicherweise eine physiologische Bedeutung hat. Es ist ja bekannt, daß einige Tiere — Vogel Turacus, Krebse, Mollusken — auch größere Konzentrationen Kupfer enthalten (*Oppenheimer*). *Warburg* (1) läßt es unentschieden, ob neben Eisen noch andere Elemente als biologische Oxydationskatalysatoren in Frage kommen, hält aber offenbar eine solche Rolle des Kupfers nicht für möglich.
In den Modellversuchen *Wertheimers* fand ich eine Bestätigung dessen, was ich an Aspergillus niger beobachtet habe, daß nämlich Kupfer die Bildung des schwarzen Sporenfarbstoffs veranlaßt und das Wachstum des Pilzes fördert.

Aus meinen Kulturlösungen entfernte ich die natürlichen Eisen-, Zink- und Kupferverunreinigungen auf eine sehr einfache Weise durch Adsorption dieser Metalle an ein kräftiges Adsorbens. Als solches benutzte ich „Carbo medicinalis *Merck*". Diese Methode ist zugleich auch gründlicher als die umständliche und unzulängliche früherer Forscher, die das gleiche Ziel durch Umkristallisieren und Destillieren zu erreichen suchten.

II. Die Wirkung von Eisen, Zink und Kupfer auf die Höhe der Trockensubstanzbildung bei Aspergillus niger.

Aspergillus niger und Eisen.

Orientierende Versuche.

Was mit der Methode der Adsorption des Eisens zu erreichen war, stellte ich mit Hilfe der von *Willstätter* angegebenen Rhodanidprobe fest, und zwar verwendete ich eine 40proz. Ammoniumrhodanidlösung, die wegen ihres eigenen, relativ hohen Eisengehalts vor jedem Gebrauch erst mit Kohle filtriert wurde, da sich die mit Kohle gereinigte Lösung nach einiger Zeit doch immer wieder rot färbte durch das Eisen, das aus der Glaswandung in Lösung ging. Ein Aufkochen dieser Lösung, wie *Willstätter* es angibt, kann hier nichts nützen. Denn obwohl die rote Färbung dabei verschwindet, bleibt doch das Eisen selbst und tritt nach Zusatz von Salzsäure und Wasserstoffperoxyd wieder in Erscheinung. Wasserstoffperoxyd mußte ich zusetzen, um auch die geringste Reduktion des Eisens auszuschließen. Mit einer so gereinigten Rhodanidlösung konnte ich durch mehr oder weniger kräftige Rotfärbung Eisen nachweisen in Leitungswasser, Regenwasser, in den Lösungen der einzelnen Nährsalze und des Zuckers, in gebrauchsfertiger Nährlösung und auch in Aqua dest.

[1]) Neuerdings berichteten *Fischer, Buch Andersen* und *Demuth* (Naturwissensch. **14**, 1181, 1926) über Heilung von Tumoren mit Kupfer und Sauerstoffüberdruck.



In allen diesen Flüssigkeiten trat jedoch nicht die geringste Färbung auf, wenn sie vorher mit Kohle filtriert waren, es sei denn, daß eine stark saure Lösung vorlag. Deshalb bezeichne ich eine solche sich nicht mehr mit Ammoniumrhodanid färbende Lösung als *chemisch* eisenfrei. Ist sie aber auch *biologisch* eisenfrei?

Wenn das Wachstum des Aspergillus niger von der Eisenkonzentration abhängig ist, dann muß das Erntegewicht des Pilzes in dem Maße, wie das Eisen in der Nährlösung schwindet, ebenfalls dem Nullpunkt zustreben. Wie ich später zeigen werde und wie aus den Kurven 1 und 2 hervorgeht, ist das in der Tat der Fall. Dann darf man aber auch den Schluß ziehen, daß solche Lösungen, auf denen Aspergillus noch wächst, auch noch Eisen enthalten, während solche, auf denen er bei im übrigen optimalen Kulturbedingungen nicht mehr wächst, kein Eisen enthalten. Solche Nährlösungen nenne ich biologisch eisenfrei. Chemisch eisenfreie, biologisch aber noch nicht eisenfreie Lösungen müssen demnach Pilzdecken hervorbringen, die das Eisen der Lösung gespeichert haben. Analysen solcher Mycelien sollten das bestätigen.

Völlig gleiche 25-ccm-Kjeldahlkolben, aus *einem* Rohr schwer schmelzbaren Jenaer Glases gefertigt, wurden mit je höchstens 0,1 g getrockneten und zerriebenen Mycels beschickt. Dieses wurde mit dem in Abderhaldens Arbeitsmethoden angegebenen Säuregemisch verascht. Ein Kolben ohne Mycel wurde als Blindversuch genau so behandelt. Die Aufschlüsse verglich ich nach *Willstätters* Methode kolorimetrisch mit einer frisch bereiteten Eisen-Standardlösung von genau abgewogenem *Mohr*schen Salz, die mit ganz wenig Salzsäuregas angesäuert wurde. (Die flüssige Salzsäure selbst enthält zu viel Eisen.) Das Resultat solcher Analysen ist aus der Tabelle von Versuch 1 zu entnehmen.

1. Versuch. 28. Mai bis 2. Juni 1924. Nährlösung: H_2O 100, Saccharose 5, NH_4NO_3 0,5, KH_2PO_4 0,25, $MgSO_4$ 0,125 mit ungefähr 1 Proz. Kohle gereinigt und dann mit Pipette zu je 50 ccm auf 300-ccm-Erlenmeyer aus gewöhnlichem Glase verteilt. Zwei Kolben ohne Eisenzusatz waren vorher mit Paraffin ausgegossen (0 P). Vor jedem Versuch habe ich Kulturkolben und Pipetten erst gründlich mit verdünnter Salzsäure, dann mit Regenwasser und zuletzt mit Aqua dest. gesäubert. Den Kolben wurden zugesetzt 1, 10, 100 und 1000 mg Fe pro 100 ccm, und zwar in Form von *Mohr*schem Salz. 1 Fe wurde immer 7 *Mohr*schem Salz gleichgesetzt.

mg Fe pro 100 ccm	Trockengewichte g		Mittlerer Wert des im Mycel gefundenen Eisens in Proz. der Trockensubstanz (je eine Veraschung und drei Bestimmungen)
0 P	0,12	0,15	0,07
0	0,35	0,15	keine Bestimmung
1	0,60	0,56	0,03
10	0,55	0,63	0,35
100	kein Wachstum		—
1000	„	„	—

Eine Förderung in der Entwicklung des Pilzes durch Eisenzusatz ist nicht zu verkennen. Jedoch ist er auch ohne Eisenzusatz noch gewachsen, wenn er auch nur ein recht dünnes, weißes Mycel gebildet hat. Das Paraffinieren des Kolbeninneren hat nicht wesentlich zur Verminderung der Trockensubstanzbildung beigetragen. Deshalb habe ich diese Maßnahme in Zukunft fortgelassen. Es ist nicht weiter verwunderlich, daß bei der hohen Eisenkonzentration kein Wachstum stattfindet, weil ja in diesem Falle fast die ganze Phosphorsäure als $FePO_4$ ausgefällt wird. Daß dies wirklich die Ursache ist, zeigen folgende Versuche:

2. *Versuch.* 12. bis 16. März 1925. Nährlösung: H_2O 100, Dextrose 5, NH_4NO_3 0,5, KH_2PO_4 0,25, $MgSO_4$ 0,125, $ZnSO_4$ 0,0001. Aus Gründen, die später dargelegt werden sollen, habe ich den Nährlösungen in Zukunft meistens etwas Zink zugefügt. Außerdem bekamen die eisenhaltigen Lösungen den Eisenmengen jeweils äquivalente Gaben KH_2PO_4.

Jeweils 25 ccm in 100-ccm-Kolben aus Jenaer 20-Glas. 30° C.

mg Fe pro 100 ccm	Frischgewicht *) g	mg Fe pro 100 ccm	Frischgewicht *) g
0	1,5	50	2,9
1	2,7	100	2,7
10	2,9		

*) Das Frischgewicht wurde immer nach Auswaschen und Abpressen der Mycelien zwischen Fließpapier ermittelt, welche Bestimmung für Vergleichsversuche, die nicht weiter ausgewertet werden sollen, völlig genügt.

3. *Versuch.* 25. bis 30. März 1925. Dieselbe Nährlösung ohne Zink. Im Gegensatz zum vorigen Versuch wurde sie aber erst mit Kohle gereinigt und ihr dann erst die verschiedenen Eisenmengen und diesen äquivalente Mengen KH_2PO_4 zugesetzt.

Je 25 ccm in 250-ccm-Kolben aus gewöhnlichem Glas.

mg Fe pro 100 ccm	Trockensubstanz g	mg Fe pro 100 ccm	Trockensubstanz g
0	0,29	10	0,50
0,5	0,49	50	0,56
3	0,54	100	0,55

Hier wurde also bei 100 Fe (= 100 mg Fe pro 100 ccm), welche Menge bei Versuch 1 schon schädlich wirkte, noch dasselbe Trockengewicht erreicht wie bei 3 Fe.

Im Versuch 1 waren die Analysenwerte für 10 Fe unnatürlich hoch und schwankten stark. Das liegt wahrscheinlich daran, daß die Mycelien nicht genügend ausgewaschen waren und zwischen den Hyphen etwas der stark eisenhaltigen Lösung zurückgeblieben war. Den

mittleren Wert habe ich in die Tabelle eingesetzt. Der Unterschied zwischen den Werten von 0 Fe und 1 Fe liegt wohl noch innerhalb der Bestimmungsfehlergrenzen. Genauere Eisenanalysen gedenke ich später durchzuführen.

Die Zahlen zeigen aber doch, worauf es ankommt, nämlich, daß Aspergillus nicht nur „Spuren" von Eisen enthält, sondern daß sogar die vom Pilz aus der chemisch eisenfreien Lösung gespeicherten Eisenmengen noch durchaus analytisch faßbar sind.

Das spricht für die Annahme, daß die chemisch eisenfreien Lösungen noch nicht völlig biologisch eisenfrei waren. Es mußte folglich alles versucht werden, die Methode der Adsorption noch zu verfeinern. Ich nahm zunächst an, daß durch das Aufsetzen der Wattestopfen wieder Verunreinigungen in die Nährlösung hineingeraten waren, und ersetzte deshalb in der nächsten Versuchsreihe die Watte durch Glaskappen. Durch diesen Versuch sollte weiterhin geprüft werden, ob die Kohle außer der Adsorption des Eisens sonst noch einen Einfluß auf den Nährwert der Lösung ausübt, und ob die Förderung des Pilzwachstums durch Eisenzusatz nicht auf dem mit dem *Mohr*schen Salz in die Lösung gelangenden Ammonsulfat beruht.

4. Versuch. 21. bis 28. Juli 1925. Kultiviert wurde bei 30°. Die Zusammensetzung der Nährlösung war dieselbe wie bei Versuch 3. Aber nach der Kohlebehandlung tropfte sie unmittelbar vom Filter in den Kulturkolben, bis in diesem die Flüssigkeitsschicht dieselbe Höhe erreicht hatte wie in einem auf horizontaler Platte dicht daneben stehenden Kolben von gleichem Inhalt und gleicher Form mit abgemessener Wassermenge. So wurde auch in Zukunft verfahren. Die Berührung der gereinigten Lösung mit der Pipette wurde so vermieden und damit eine Quelle erneuter Verunreinigung ausgeschaltet.

Je 25 ccm in 250-ccm-Kolben aus Jenaer 20-Glas.

Je zweimal:

a) ohne Kohlebehandlung mit $(NH_4)_2SO_4$ (äquiv. 1 Fe);
b) ohne Kohlebehandlung + 1 Fe;
c) mit Kohle behandelt, mit $(NH_4)_2SO_4$ (äquiv. 1 Fe);
d) mit Kohle behandelt, mit 1 Fe.

Die Pilzdecken ließen sich, nach ihrer Dicke geordnet, mit deutlichen Unterschieden in folgender Reihe anordnen: $c < a < b < d$.

Beim Trocknen der Mycelien sind diese leider durch einen unglücklichen Zufall verbrannt. Dessenungeachtet konnte ich aus den Versuchsergebnissen schließen, daß die minimalen Mengen Ammonsulfat nicht den wirksamen Faktor im *Mohr*schen Salz darstellen. Außerdem konnte ich deutlich erkennen, daß die Lösung nach der Behandlung mit Kohle an Nährwert nichts einbüßt, sondern eher noch gewinnt. Nur ist es dem Pilz infolge dieser Behandlung des Nährmediums nicht mehr möglich, Sporen zu bilden (s. Kapitel über Zink, S. 315).

Die eisenfreien Lösungen haben auch diesmal wieder ein schwaches Wachstum des Pilzes ermöglicht. Daran haben also auch die Glas-

kappen nichts zu ändern vermocht. Sie wurden deshalb nicht wieder verwendet.

Ich suchte weiter, die Methode der Reinigung zu verfeinern. Als Kohlenstoffquelle benutzte ich in Zukunft nur noch Dextrose. Die Kulturkolben, von nun an immer aus dem zinkfreien Jenaer 20-Glas, wurden nach der beschriebenen Reinigung auch noch einmal mit filtrierter Nährlösung ausgespült, denn das Aqua dest. konnte ja Spuren Eisen zurückgelassen haben. Folgender Versuch schien diese Vorsichtsmaßnahme zu rechtfertigen.

5. Versuch. 16. bis 22. Mai 1925. Nährlösung: H_2O 100, Dextrose 5, NH_4NO_3 0,5, KH_2PO_4 0,25, $MgSO_4$ 0,125. Mit Kohle gereinigt. Im Kolben, der nicht mit Nährlösung gespült war, erntete ich 7,2 g Frischgewicht, im mit Nährlösung gespülten 5 g.

Bei einer Wiederholung des Versuchs hatte die Spülung mit gereinigter Nährlösung kein Sinken des Erntegewichts zur Folge. Trotzdem habe ich diese Maßnahme zur Sicherheit beibehalten.

Mehrfaches Filtrieren mit Kohle verminderte das Erntegewicht nicht. Dagegen erwies es sich als vorteilhaft, statt durch gewöhnliches Filtrierpapier durch quantitative Filter zu filtrieren. Im Gegensatz zur salzsauren Abkochung quantitativer Filter enthielt denn auch die der gewöhnlichen Filter bedeutende Eisenmengen. Kulturen in Quarzschalen statt in Glaskolben lieferten im wesentlichen dieselben Erntegewichte. Günstigstenfalls wurde immer nur ein Trockengewichtsverhältnis $-$ Fe : $+$ Fe $= 1 : 5$ erreicht, dasselbe, was auch *Molisch* bei seinen Versuchen erzielte[1]).

Daß die Nährlösungen tatsächlich immer noch genügende Mengen Eisen enthielten, konnte ich zeigen, wenn ich — wie das auch *Molisch* getan hat — dieses Eisen durch den Pilz selbst herausnehmen ließ.

6. Versuch. 17. Juni 1925. Nährlösung wie im vorigen Versuch. Je 100 ccm in ½-Liter-Kolben. 30° C.

Erste Ernte am 20. Juni: a) 0,6 g und b) 1 g Frischgewicht. Nun bekam die Lösung b) ein Körnchen *Mohr*sches Salz. Beimpft wurde aus begreiflichen Gründen nicht wieder.

Zweite Ernte am 25. Juni: nach dreistündigem Trocknen bei 100° wogen die geernteten Mycelien: a) ($-$ Fe) 0,04 g, b) ($+$ Fe) 0,37 g.

Dasselbe kann man aber auch schneller und — was das wichtigste ist — noch gründlicher durch Adsorption erreichen, wenn man nur statt der schwach sauren eine schwach alkalische Nährlösung verwendet. Die Erklärung hierfür liegt auf der Hand. Eine verhältnismäßig stark saure Nährlösung, die freie Säure enthält, läßt sich durch Adsorption weder biologisch eisenfrei noch chemisch eisenfrei

[1]) Die Angabe *Czapeks* (Bd. II, S. 345), *Raulin* habe ein Trockengewichtsverhältnis 1 : 27 erreicht, ist ein Druckfehler. Nicht 1 : 27, sondern 1 : 2,7.

machen. Das beweist das üppige Wachstum des Aspergillus und die Rhodanidprobe. Eine schwach saure Nährlösung mit 0,25proz. KH_2PO_4 dagegen läßt sich wohl chemisch eisenfrei, nicht aber völlig biologisch eisenfrei mit Kohle reinigen. Das geht aus obigen Versuchen hervor. In diesen schwach sauren phosphathaltigen Lösungen liegt aber das Eisen zum Teil in Kolloid- oder Suspensoidform vor, und nur diese gröberen Teilchen werden restlos adsorbiert, während die Adsorption der Ionen kaum in Frage kommt. Es liegt also nahe, noch einen Schritt weiter zu gehen und eine schwach alkalische Nährlösung zu verwenden. Dann muß aller Voraussicht nach praktisch sämtliches Eisen als Kolloid oder Suspensoid von der Kohle herausgenommen werden.

In der Tat ist das der Fall, wie folgende orientierende Versuche zeigen.

7. Versuch. 1. bis 6. Juli 1925. Nährlösung:

A (alkalisch)		S (sauer)
H_2O	200	H_2O
Dextrose	10	Dextrose
KNO_3	1	NH_4NO_3
K_2HPO_4	0,5	KH_2PO_4
$MgSO_4$	0,25	$MgSO_4$
$ZnSO_4$	0,0002	$ZnSO_4$
± Fe	0,01	± Fe

Mit Kohle gereinigt.

Je 100 ccm in ½-Liter-Kolben. 25 bis 30° C.

Zink wurde immer als Zinksulfat gegeben (1 Zink = 4,4 $ZnSO_4$ 7 aqua). Es mußte fortan natürlich wie das Eisen nach der Filtration zugesetzt werden. Deshalb war es nötig, eine Zinksulfatlösung bestimmten Gehalts ebenfalls mit Kohle zu reinigen und hiervon der Nährlösung mit in bekannter Weise gereinigter Pipette eine entsprechende Menge zuzusetzen.

Frischgewichte:

S + Fe 4,1 g	A + Fe 3,8 g
S − Fe 0,6 g	A − Fe 0,15 g

A + Fe : − Fe = 25,3 : 1
S + Fe : − Fe = 6,9 : 1

8. Versuch. 13. bis 17. Juni 1925. Nährlösung: H_2O 4000, Dextrose 120, KNO_3 20, Asparagin 17, K_2HPO_4 (A = alkalisch) bzw. KH_2PO_4 (S = sauer) 10, $MgSO_4$ 5; ferner $ZnSO_4$ 0,2 mg pro 100 ccm, ± Fe 10 mg pro 100 ccm.

In Schalen kultiviert zu je 1 Liter. Nicht sterilisiert! 30° C. Die Frischgewichte waren:

A + Fe 72,4 g;	S + Fe 73,7 g;
A − Fe annähernd 0;	S − Fe 60,8 g.

A + Fe und A − Fe waren stark mit Bakterien infiziert. A − Fe hatte nur einige äußerst zarte Mycelfetzen gebildet. Deren Frischgewicht kam praktisch nicht in Frage, war jedenfalls weniger als 1 g.

Obwohl bei diesen Versuchen die Parallelkulturen fehlen, konnte ich doch aus ihnen schließen, daß durch Adsorption in alkalischer Lösung der Beweis für die Notwendigkeit des Eisens leicht zu erbringen war.

Die Reaktion der Nährlösung[1]).

Es fragt sich aber zunächst noch, ob nicht die schwache Alkalität der Nährlösung auf das Wachstum des Aspergillus niger an sich ungünstig wirkt. Wenn die noch jetzt allgemein gültige Anschauung früherer Autoren (*Brenner*) richtig ist, daß Aspergillus auf alkalischen Medien nur schlecht gedeiht, dann durfte ich solche eben nicht verwenden. Nun ist diese Ansicht allerdings insofern richtig, als man tatsächlich in schwach alkalischer Nährlösung oft ein geringeres Erntegewicht erzielt als in schwach saurer. Dies scheint mir jedoch nicht an der Konzentration der H-Ionen unmittelbar zu liegen, ganz abgesehen davon, daß der Pilz eine Nährlösung mit K_2HPO_4 und Nitrat sehr bald sauer und erst dann wieder alkalisch macht. Die Wachstumshemmung, die wahrscheinlich unmittelbar nach der Keimung am größten ist, solange der Pilz noch nicht genügend organische Säuren gebildet hat, ist vielmehr auf eine Fällung des Eisens und auch — wie ich weiter unten zeigen werde — des Zinks zurückzuführen. Denn wenn dem Pilz viel Eisen zur Verfügung steht, ist die Anfangsreaktion in der Nährlösung, ob schwach sauer oder schwach alkalisch, völlig belanglos. (Natürlich hat das seine Grenzen. Der Pilz wird auf stark alkalischer Lösung ebenso wenig wachsen wie auf stark saurer.) Folgende Versuche zeigen das:

9. Versuch. 8. bis 13. Januar 1926. Nährlösung A von Versuch 7. Ein Teil davon mit einer Spur Essigsäure angesäuert. Je 50 ccm in 250-ccm-Kolben. 30° C. Beide mit 10 mg Fe und mit 0,9 mg Zn pro 100 ccm.

Die vom 15. bis 18. Januar bei 30° getrockneten Mycelien wogen:

A (alkalisch)	0,43 g	und	0,45 g
S (sauer)	0,44 g	„	0,48 g.

10. Versuch. 16. bis 23. Janauar 1926. Nährlösung: H_2O 300, Dextrose 15, KNO_3 1,5, K_2HPO_4 (A) bzw. KH_2PO_4 (S) 0,75, $MgSO_4$ 0,4, Fe 0,03, $ZnSO_4$ 0,003.

Je 25 ccm in 100-ccm-Kolben. 25 bis 30° C. Die Mycelien, vom 23. bis 26. Januar bei 30° getrocknet, wogen:

A	0,48 g	und	0,47 g.
S	0,23 g	„	0,24 g.

[1]) Da Aspergillus auch in ursprünglich alkalischen Lösungen schnell Säure bildet, so war eine Eisenpufferung durch Citrate, wie sie von manchen Autoren bei anderen Organismen angewendet wird, nicht notwendig.



11. Versuch. 2. bis 8. Februar 1926. Dieselbe Nährlösung wie beim 11. Versuch; aber diesmal nur halb soviel KH_2PO_4 bzw. K_2HPO_4.

Je 25 ccm in 100-ccm-Kolben. 25 bis 30° C. Trockengewichte:

A 0,35 g und 0,33 g,
S 0,23 g „ 0,24 g.

Von einer schädlichen Wirkung der Alkalität ist hier also nichts zu merken. Eher ist das Gegenteil der Fall: Die H-Ionen des KH_2PO_4 scheinen zu hemmen. (Der geringe Unterschied in der Kalium- und Phosphorkonzentration ist sicher nicht die Ursache.) Dieses eigenartige Verhalten des sauren Phosphats gilt bei meinen Versuchen jedoch nur für Nitrat als N-Quelle, nicht für Ammoniakstickstoff, der aber wegen seiner besseren Assimilierbarkeit nicht ohne weiteres mit Nitratstickstoff verglichen werden kann. Diese ganzen Verhältnisse sind aber noch nicht genügend geklärt.

12. Versuch. 10. bis 15. Februar 1926. Nährlösung:

A (alkalisch)	S (sauer)
H_2O 400	H_2O 400
Saccharose 20	Saccharose 20
$MgSO_4$ 0,5	$MgSO_4$ 0,5
$NaNO_3$ 5,8	NH_4NO_3 2
K_2HPO_4 1,75	KH_2PO_4 1
	K_2SO_4 0,6

Beide mit 10 mg Fe und 5 mg $ZnSO_4$ pro 100 ccm. Je 25 ccm in 100-ccm-Kolben. 25 bis 30° C. Mycelien vom 15. bis 17. Februar bei 30° C getrocknet.

A 0,46 g und 0,46 g,
S 0,50 g „ 0,51 g.

Aus den Untersuchungen von *Nikitinsky*, *Brenner*, *Ritter*, *Butkewitsch* (1) und besonders *Wehmer* (3) ist ferner bekannt, daß Wachstum und Sporenbildung des Aspergillus in physiologisch sauren Nährmedien oft auffallend gehemmt werden. Ich konnte diese „Selbstvergiftung" des Pilzes bestätigen, die besonders dann sehr auffällig war, wenn die Nährlösungen reichliche Mengen Zink enthielten.

Ergänzend sei auch schon hier kurz angeführt, daß der Pilz nur auf physiologisch neutralen und schwach alkalischen Nährlösungen entsprechend einem höheren Mycelgewicht auch mehr Sporen und besonders mehr Farbstoff und Humine bildet (siehe die entsprechenden Kapitel S. 332, 333, 336).

Auf jeden Fall geht aus obigen Versuchen hervor, daß ich eine ungünstige Wirkung der alkalischen Reaktion an sich nicht zu befürchten brauchte, daß vielmehr solche alkalischen Nährlösungen für

Aspergillus zum mindesten unschädlich waren, in einigen Fällen sogar schwerere Pilzdecken hervorbrachten als die sauren. Es sei hier noch besonders hervorgehoben, daß, wie eine Durchsicht der Literatur zeigt, viele Autoren auch die Ausfällung von Ammoniummagnesiumphosphat bei Verwendung alkalischer Lösungen oder Zusatz von Calciumcarbonat nicht berücksichtigt haben. Deshalb wurde bei obigen und späteren Versuchen der Stickstoff in alkalischen Reihen stets in Form von Alkalinitrat gegeben.

Das Verfahren zur Reinigung der Kulturlösung vom Eisen.

Nunmehr ist der Weg, den ich zu gehen hatte, um die Nährlösung möglichst vollkommen vom Eisen zu befreien, gegeben. Er sei hier ausführlich beschrieben.

Zunächst mögen die beiden folgenden Versuche Aufschluß geben über die zur Adsorption notwendige Kohlemenge.

13. Versuch. 6. bis 16. November 1925. Adsorption in *schwach saurer* Lösung. H_2O 100, Dextrose 5, NH_4NO_3 0,5, KH_2PO_4 0,25, $MgSO_4$ 0,125.

Je 50 ccm in 250-ccm-Kolben aus Jenaer 20-Glas. ½ Minute mit Kohle geschüttelt. 30° C.

Kohle Proz.	Gewicht der lufttrockenen Mycelien in g	
0	0,7	0,75
0,001	0,67	0,73
0,01	0,60	0,65
0,1	0,61	0,63

14. Versuch. 11. bis 14. Januar 1926. Adsorption in *schwach alkalischer* Lösung. Dieselbe Dextroselösung mit KNO_3 statt NH_4NO_3 und K_2HPO_4 statt KH_2PO_4.

Je 50 ccm in 250-ccm-Kolben aus Jenaer 20-Glas. ½ Minute mit Kohle geschüttelt. 27 bis 30° C.

Kohle Proz.	Gewichte der lufttrockenen Mycelien in g	
0	0,10	0,24
0,001	0,02	0,02
0,01	0,01	0,02
0,1	0,01	0,02
1	0,02	0,02
5	0,007	0,009

Infolge der Alkalität wird auch das Zink zum großen Teil adsorbiert. Daher rühren die viel niederen Erntegewichte bei 0 Proz. Kohle.

Aus beiden Versuchen geht unzweideutig hervor, daß die Adsorption in saurer Lösung nur einen ganz minimalen Erfolg hat. Dagegen wirken in der alkalischen Lösung 0,001 Proz. Kohle schon fast maximal. Welche Kohlemenge ich in Zukunft verwendete, habe ich jeweils angegeben.

Die Nährlösung der unten wiedergegebenen entscheidenden Versuche hatte folgende Zusammensetzung: Aqua dest., Saccharose (die reinere Dextrose zu verwenden, war nun nicht mehr nötig), KNO_3 oder $NaNO_3$, K_2HPO_4 und $MgSO_4$. Diese schwach alkalische Lösung, die Eisen fast nur noch in grob disperser Form enthält, wurde mit *Merck*scher Blutkohle ungefähr ½ Minute gut durchgeschüttelt und dann durch sauber gefaltete quantitative Filter und durch mit verdünnter Salzsäure, Regenwasser und Aqua dest. weitgehend gereinigte Trichter in ebenso gereinigte Jenaer Erlenmeyer aus 20-Glas filtriert. Die ersten etwa 30 ccm Filtrat wurden zur Kohle zurückgegossen, dann wurde jeder Kolben einmal mit 10 bis 20 ccm Filtrat gut ausgeschwenkt und auch wieder in die kohlehaltige Lösung entleert. Diese wurde dann noch einmal gut durchgeschüttelt und endgültig in die völlig gleichen Kulturkolben filtriert. Es wurde so lange filtriert, bis die Schichthöhe dieselbe eines genau gleichen Kolbens mit abgemessener Menge Wasser, der auf horizontaler Platte dicht neben dem Kulturkolben stand, erreicht hatte. So wurde eine bis auf wenige Tropfen genaue Verteilung der Nährlösung gewährleistet, ohne daß die Gefahr einer erneuten Verunreinigung mit Eisen bestand. Sterilisation — wenn ausnahmsweise *nicht* sterilisiert wurde, habe ich jedesmal angegeben. — und Impfung mit dem Platindraht, der auch, wie oben beschrieben, gereinigt war, mußten selbstverständlich ebenfalls unter Berücksichtigung der großen Verunreinigungsgefahr vorgenommen werden. Vor der Sterilisation wurde jedem Kolben eine bestimmte Menge einer mit Kohle filtrierten Zinksulfatlösung (chemisch rein) und später auch von einer so behandelten Kupfersulfatlösung zugefügt. Die Kolben wurden mit chemisch reiner Watte vorsichtig verschlossen. Die geringen Spuren Eisen, die beim Säuren der Lösung gegebenenfalls aus dem Glase in Lösung gehen, mußten mit in Kauf genommen werden, denn es gibt wohl kein Material, das nicht geringste Spuren enthielte. Auch bin ich mir darüber klar, daß auf diese Weise noch längst nicht das letzte Atom Eisen aus der Lösung herausgenommen wurde, und daß auch Filter und Impfmaterial wieder Spuren davon in die Lösung hineinbrachten.

Jedoch genügt dieses Verfahren vollkommen, um damit die Notwendigkeit des Eisens für Aspergillus zu beweisen.

Die Lebensnotwendigkeit des Eisens für Aspergillus niger.

Die schwach alkalischen Nährlösungen wurden bei diesen Eisenversuchen analog denen über Zink und Kupfer auch noch mit einer Spur Ammoniumsulfid versetzt, obgleich die schwache Alkalität zur Adsorption des Eisens allein genügt. Der Zusatz konnte jedoch nicht schaden, sondern höchstens die völlige Eisenfällung sichern.

Bei einem Versuch, den ich ohne besondere Kupfergabe durchführte, erhielt ich folgende Resultate:

15. Versuch. 8. bis 13. März 1926. Nährlösung: H_2O 2200, Saccharose 220, $NaNO_3$ 22, K_2HPO_4 10, $MgSO_4$ 5 mit einer Spur Ammoniumsulfid und 5 Proz. Kohle gereinigt[1]) + 0,4 mg Zink pro 100 ccm. Ungefähr die Hälfte von Mg und P war vor der Filtration ausgefallen.

Je 50 ccm in 250-ccm-Kolben. 25° C.

Die Mycelien hatten alle mit Ausnahme derjenigen ohne Eisen, mit 0,001 Fe und der mit * bezeichneten Kultur wenig gelbe Sporen gebildet. Bei den anderen waren die Sporen schwarz gefärbt (s. Kapitel über Kupfer S. 324). Eigentümlich und besonders bemerkenswert ist es, daß bei diesem Versuch sowohl wie auch sonst der Pilz ohne Eisen fast nur untergetaucht wuchs.

mg Fe pro 100 ccm	Trockensubstanz in g		mg Fe pro 100 ccm	Trockensubstanz in g	
0	0,049	0,053	0,5	1,165	1,458 *)
0,001	0,140	0,104	0,7	1,151	1,135
0,01	0,436	0,438	0,85	1,160	1,168
0,1	1,175	1,167	1	1,088	1,168
0,2	1,180	1,140	10	1,258	1,189
0,25	1,149	1,129	30	1,102	1,027

*) In diesen Kolben war beim Sterilisieren ein wenig Kondenswasser des kupfernen Sterilisators hineingeflossen. (Siehe Kapitel über Kupfer, S. 324.)

Die Pilzernte steigt, wie aus der Tabelle und Kurve 1 ersichtlich ist, von 0,05 bis 1,2 g, entsprechend 0 bis 0,1 Fe; und zwar steigt die Kurve anfangs äußerst steil an (in der Abbildung mit Absicht sehr auseinandergezogen), um dann allmählich zur Horizontalen umzubiegen. Diese Eisenkurve ist eine typische Nährwertkurve, und das Eisen ist also ebensogut ein unbedingt lebensnotwendiges Element wie die anderen der Lösung auch.

Daß der Anstieg der Kurve im Abschnitt der niedrigen Eisengaben sehr steil ist, macht es erklärlich, weshalb man so äußerst vorsichtig arbeiten muß, um den Nullpunkt der Kurve dem absoluten Nullpunkt möglichst nahe zu bringen. Die geringste Unsauberkeit läßt den Schnitt-

[1]) Obwohl nach Versuch 14 schon etwa 0,001 Proz. Kohle maximal wirken, habe ich doch stets eine sehr viel höhere Menge genommen, da die Kohlewirkung nicht immer sehr gleichmäßig war: auf diese Weise konnte immer mit einer Maximalwirkung gerechnet werden.



punkt der Kurve mit der Ordinate sofort beträchtlich vom absoluten Nullpunkt abrücken[1]).

Ein noch idealeres Bild gibt die Kurve des nächsten Versuchs.

16. Versuch. 28. März bis 5. April 1926. Dieselben Kulturkolben. Nährlösung: H_2O 1500, Saccharose 150, $NaNO_3$ 15, K_2HPO_4 3,75, $MgSO_4$ 2. Mit einer Spur Ammoniumsulfid und 5 Proz. Kohle gereinigt. Zn 0,4 mg, Cu 0,1 mg pro 100 ccm. 20 bis 25° C.

mg Fe pro 100 ccm	Trockensubstanz in g		mg Fe pro 100 ccm		Trockensubstanz in g	
0	0,05	0,03	0,07	mit Bakterien infiziert	1,36	1,47
0,001	0,13	0,10	0,1		1,41	1,12
0,01	0,94	0,98	0,5		—	—
0,02	1,28	1,33	1		—	—
0,04	1,47	1,44	10		—	—

Diesmal steigt die Kurve (2) noch höher an[2]). Das ist die Wirkung des Kupfers (siehe das betreffende Kapitel S. 324). Sie verläuft in ihrem unteren Teile fast geradlinig. Diese Tatsache gestattet die Berechnung des in der Nährlösung noch vorhandenen Eisens, denn aus dem steilen Aufstieg dürfte wohl ohne weiteres zu schließen sein, daß bei völliger Eisenfreiheit der Nährlösung die Kurve tatsächlich den Nullpunkt erreicht hätte. Daß sie ihn nicht erreicht hat, läßt noch vorhandene Eisenspuren vermuten. Diese Eisenmenge kann man aus der Kurve direkt ablesen. Führt man sie zum Schnitt mit der Abszisse, dann ist die gesuchte Eisenmenge gegeben durch den Abszissenabschnitt von diesem Schnittpunkt bis zum Nullpunkt. In diesem Falle beträgt der Wert $4 \cdot 10^{-6}$ mg pro Kubikzentimeter Lösung. Soviel Eisen ist aber *höchstens* noch in der Lösung vorhanden gewesen, denn diese Zahl umfaßt unter anderem auch noch den gewiß relativ nicht geringen Eisengehalt der Impfsporen.

Diese Berechnung gilt jedoch nur für den Fall, daß die Annahme, das Wachstum höre bei 0 Fe auf, zutrifft. Es ist aber auch möglich, wenn auch durchaus nicht wahrscheinlich, daß dies schon eintritt, wenn noch minimalste Spuren Eisen vorhanden sind.

Leider habe ich bei Aufstellung dieser Kurve die Kulturen mit höheren Eisengaben nicht verwerten können. In ihnen hatte sich nämlich in den letzten Tagen eine üppige Bakterienflora entwickelt, teils mehr, teils weniger. Die Gewichte der betreffenden Mycelien waren natürlich viel zu gering und stark schwankend. Wohl hatte ich dreimal sterilisiert; aber um sauberer zu verfahren, hatte ich die Wattestopfen beim Impfen nicht abgebrannt.

---

1) Siehe auch Anhang und Kurve 3 und 4. (S. 355.)

2) Diese Eisenkurve konnte ich nicht mit einzeichnen, weil sie sich fast vollkommen mit der Zinkkurve (2) deckt.

Die Lösungen mit wenig Eisen und ohne Eisen zeigten kein Bakterienwachstum und waren im Gegensatz zu den anderen sauer. Wie ich mich bei anderen Versuchen überzeugen konnte, werden die alkalinitrathaltigen Kulturen mit Eisen immer auch erst sauer und dann sehr bald alkalisch. Die Pilze mit wenig Eisen und ohne Eisen bleiben also in ihrer Entwicklung auf der Stufe der Säuerung stehen. Anders ist es, wenn in einer eisenarmen Nährlösung Bakterien wachsen, ehe Aspergillus zur Entwicklung kommt. Als ich einmal eine Nährlösung mit Dextrose, Ammonnitrat und primärem Phosphat, die mit Bakterien infiziert war, mit Aspergillus geimpft hatte, waren die Sporen nach 5 Tagen makroskopisch noch nicht gekeimt. Dann fügte ich zur einen Parallelen ein Körnchen *Mohr*sches Salz. Zwei Tage darauf hatte diese eine starke Decke gebildet (0,3 g Trockengewicht auf 25 ccm Lösung), während die Sporen der anderen Parallelen erst zu einem zarten Keimmycel ausgewachsen waren. Ich kann mir diesen Fall nicht anders erklären, als daß die Bakterien die nicht adsorbierten Reste Eisen resorbiert hatten und dem Aspergillus das Wachstum dadurch fast unmöglich gemacht war.

Aspergillus niger und Zink.

Orientierende Versuche.

Nach einer Reihe von orientierenden Versuchen über das Eisen mußte ich feststellen, daß Aspergillus nicht mehr so gut wachsen wollte wie zu Beginn der Untersuchungen. Es schien zunächst rätselhaft, wodurch die stets in gleicher Weise hergestellte Nährlösung an Wert eingebüßt haben sollte. *Lappalainen* hat aber schon beobachtet, daß die Wachstumsgröße des Aspergillus weitgehend abhängig ist vom Zinkgehalt der Kulturgefäße. Da ich meine Kulturen stets in denselben Kolben angesetzt hatte, mußte ich annehmen, daß aus ihnen das Zink allmählich von den aufeinanderfolgenden Pilzgenerationen verbraucht war. Diesen Mangel konnte ich dadurch wieder gutmachen, daß ich in ganz neuen Erlenmeyern kultivierte, oder auch dadurch, daß ich den schwach sauren Nährlösungen etwas Blutkohle zusetzte. Wie ich bereits S. 306 erwähnt habe, genügt auch schon die Filtration mit Kohle, um das Wachstum zu fördern.

War wirklich das Zink die Ursache, dann mußte ein Zusatz von einer Spur Zinksulfat die gleiche Wirkung ausüben und der Pilz in den ausgenutzten Kolben wieder gut gedeihen. Das war auch der Fall. Das Erntegewicht war mit Zink größer als ohne Zink. Aber trotzdem sah der Pilz auf der Zinkkultur nicht normal aus. Die krankhaft weiße, fast sporenlose Decke war stark gefaltet und immer noch verhältnismäßig dünn. Wenn, wie ich vermutete, diese „Spur" Zinksulfat tatsächlich schon zuviel gewesen sein sollte, dann schien damit die An-

schauung *Richters* bestätigt zu sein, daß nur Zinkion das Wachstum des Aspergillus fördert, das nicht ionisierte $ZnSO_4$ dagegen stark giftig wirkt. Um die günstigste Konzentration herauszufinden, kultivierte ich mit verschiedenen Zinkmengen und fand, daß in einer Lösung mit Ammonnitrat und primärem Phosphat etwa 0,1 mg Zinksulfat pro 100 ccm eine optimale Wirkung ausübte. Aber auch hier verriet der Pilz durch sein weißes, sporenloses Mycel eine Schädigung. Auch schien mir das Erntegewicht früherer Versuche noch nicht ganz erreicht zu sein. Höhere Gaben Zink hatten eine geringe Hemmung hervorgerufen.

Die Reaktion der Nährlösung.

Ich habe schon im Kapitel über Eisen erwähnt, daß eine zu hohe H -Konzentration den Aspergillus stark schädigt, und habe auch schon darauf hingewiesen, daß diese Schädigung besonders dann leicht eintritt, wenn reichliche Mengen Zink zugegen sind. Die oben erwähnten Mycelien, auf zinkhaltiger saurer Lösung gewachsen, machten mir nun den Eindruck, als litten sie unter einer solchen Säurevergiftung. Diese Vermutung wurde durch folgende Versuche bestätigt:

17. Versuch. 31. Oktober bis 4. November 1925. Nährlösung: H_2O 100, Dextrose 10, N-Quelle 1, KH_2PO_4 bzw. K_2HPO_4 0,5, $MgSO_4$ 0,25, Fe 0,01, $\pm$ $ZnSO_4$ 0,0002. Als N-Quelle NH_4NO_3, $(NH_4)_2SO_4$, KNO_3 (letzteres mit K_2HPO_4 statt KH_2PO_4). 30° C.

Die erste Kultur auf diesen Lösungen (je zwei Parallelen) vom 27. bis 31. Oktober. Dann erntete ich und beimpfte wieder kräftig, nachdem ich mich überzeugt hatte, daß von Zucker und von sämtlichen Salzen noch genügend vorhanden war. Am 4. November zeigten die einzelnen Kulturen folgendes Bild:

NH_4NO_3. — Zn: Mehrere sehr schwache, glatte, weiße, krankhaft aussehende Mycelinseln. Gar keine Sporen. + Zn: Nichts!

$(NH_4)_2SO_4$. — Zn: Ebenso wie NH_4NO_3 — Zn. + Zn: Sieben sehr kleine, schneeweiße Mycelinseln.

KNO_3. — Zn sowohl wie + Zn hatten geschlossene starke Decken und ziemlich viel Sporen gebildet.

Nach Neutralisation der beiden sauren Lösungen mit NaOH brachten diese in kurzer Zeit genau so starke, sporenreiche Decken hervor wie die mit KNO_3.

Auch die ersten Kulturen auf den beiden sauren Lösungen waren im Gegensatz zu denen auf der alkalischen Lösung fast ganz ohne Sporen geblieben (+ Zn viel weniger Sporen als — Zn). Der Pilz kommt also gar nicht zur Erzeugung von Konidien, sondern wird schon vorher durch die in Freiheit gesetzte Säure getötet, und zwar wird diese gewaltsame Sistierung der Mycelentwicklung um so schneller und gründlicher erreicht, je mehr Zink die Lösung enthält. Die in

Wahrheit fördernde Wirkung des Zinks wurde also durch diese Säurevergiftung verdeckt. Folglich konnte ich nur physiologisch neutrale oder alkalische N-Quellen benutzen.

Aber selbst dann kann Zink hemmend wirken, nämlich bei Gegenwart von Nitrat und saurem Phosphat statt des alkalischen.

18. Versuch. 16. bis 23. Januar 1926. Nährlösung: H_2O 300, Dextrose 15, KNO_3 1,5, KH_2PO_4 (S) bzw. K_2HPO_4 (A) 0,75, $MgSO_4$ 0,4, Fe 0,03; ± 0,001 Proz. $ZnSO_4$. 25 ccm in 100-ccm-Kolben. 24 bis 27° C. Am 17. Januar waren alle gekeimt. Am 18. Januar war die Mycelentwicklung bei A — Zn < A + Zn < S — Zn < S + Zn. Am 23. Januar aber ergaben die Gewichte der lufttrockenen Mycelien ein ganz anderes Bild. Denn inzwischen hatte sich auf den sauren Lösungen die Hemmung mehr und mehr geltend gemacht die durch Zink noch mehr verstärkt wurde.

	Sporen	Gewichte in g	
A — Zn	viel Sporen	0,44	0,44
A + Zn	„ „	0,48	0,48
S — Zn	weniger „	0,29	0,32
S + Zn	wenig schwach entwickelte Sporen	0,23	0,24

19. Versuch. 2. bis 8. Februar 1926. Nährlösung: H_2O 500, Dextrose 25, KNO_3 5, KH_2PO_4 (S) bzw. K_2HPO_4 (A) 0,7, $MgSO_4$ 0,5, Fe 0,05; ± 0,001 Proz. $ZnSO_4$. 25 ccm in 100-ccm-Kolben. 25 bis 30° C. Mycelien und Lösungen — das ist auch charakteristisch — sahen wie folgt aus:

S — Zn: wenig Sporen, Lösung gelbbraun.
S + Zn: fast keine Sporen, Lösung farblos.
A — Zn: viel Sporen, Lösung gelb.
A + Zn: viel Sporen, Lösung rotbraun.

Innerhalb vergleichbarer Umstände gilt allgemein, daß junge Kulturen ein um so geringeres Erntegewicht aufweisen, je weniger ihre Nährlösung gefärbt ist (s. auch Versuch 45).

	Trockengewicht in g			Trockengewicht in g	
S — Zn	0,30	0,35	A — Zn	0,24	0,22
S + Zn	0,23	0,24	A + Zn	0,35	0,33

Betrachtet man die obigen Versuche, so muß man sagen, daß auch die von früheren Autoren zitierte Giftwirkung des Zinks erst auf dem Umwege über eine zu schnelle und zu starke Erhöhung der H˙-Konzentration zur Geltung kommt. Das Zink macht aus physiologisch sauren N-Quellen vielleicht durch katalytische Beeinflussung des Eiweißstoffwechsels (*Bodansky*, *Birckner*, *Cristol*, *Rost*) schnell und reichlich den Säurerest frei. Dann tritt Säuretod ein [*Wehmer* (3)]. Außerdem wirkt es in Lösungen mit KNO_3 und KH_2PO_4 hemmend. Aus Versuchen 18 und 22 geht jedoch hervor, daß auch in solchen Fällen

das Zink anfangs fördernd wirkt und die Hemmung erst später einsetzt. Auf die eigenartig ungünstige Konstellation von KNO_3 mit KH_2PO_4 habe ich schon im Kapitel über Eisen hingewiesen.

Ganz allgemein muß gesagt werden, daß man erst im übrigen optimale Ernährungsbedingungen schaffen muß, ehe man darüber entscheidet, ob Zink giftig oder fördernd wirkt. Bei optimaler Magnesiumsulfat-Konzentration z. B. wurde mit 20 mg $ZnSO_4$ pro 100 ccm noch das Maximum an Erntegewicht erreicht. Bei Magnesiumsulfat-Mangel aber verhinderte diese $ZnSO_4$-Konzentration das Wachstum schon vollkommen.

20. Versuch. 16. bis 22. Oktober 1925. Nährlösung: H_2O 100, Dextrose 5, NH_4NO_3 0,5, KH_2PO_4 0,25, $MgSO_4$ 0,125, Fe 0,01.
25 ccm in 100-ccm-Kolben. 20 bis 25° C.

$MgSO_4$ . . . . Proz.	0		0,002		0,2		2	
mg $ZnSO_4$ pro 100 ccm	Frischgewicht in g							
0	0	0	0,3	0,4	1,1	1,2	1,5	1,9
0,002	0	0	0,4	0,4	1,5	1,7	1,6	1,4
0,2	0	0	0,4	0,4	2,5	2,1	2,0	2,2
20	0	0	0	0	2,4	2,3	2,3	2,2

Zugleich ist dieser Versuch auch ein Beweis dafür, daß Zink in sauren Lösungen mit NH_4NO_3 und KH_2PO_4 ebenfalls ein Ansteigen des Erntegewichts hervorruft (vgl. Versuch 23). Daß dem Zink in KH_2PO_4-haltigen Lösungen an und für sich keine schädigende, sondern eine fördernde Wirkung zukommt, konnte ich außerdem mit einer Nährlösung zeigen, die als N-Quelle Harnstoff enthielt.

21. Versuch. 15. bis 19. Juni 1925. Nährlösung von Versuch 20. Statt NH_4NO_3 Harnstoff.
25 ccm in 100-ccm-Kolben. 25 bis 30° C.

mg Zn pro 100 ccm	Frischgewichte in g	
0	1,7	1,7
0,2	2,4	2,9

Nach obigen Versuchen kommt eine unmittelbar schädliche Wirkung des Zinks überhaupt nicht in Frage (von extrem hohen Konzentrationen abgesehen). Was schädigend wirkt, ist meistens eine zu starke Erhöhung der $H^{\cdot}$-Konzentration.

Aber auch eine zu niedrige $H^{\cdot}$-Konzentration (Alkalität) kann das Wachstum des Pilzes hemmen. Nämlich dann, wenn die durch die Alkalität hervorgerufene Fällung des Zinks nicht durch Zusatz eines Zinksalzes wieder ausgeglichen wird, wie Versuch 22 zeigt, wobei durch den Kalkzusatz eine geringe aber ständige Alkalität während der ganzen Versuchsdauer aufrecht erhalten wurde.

22. *Versuch.* 28. Januar bis 3. Februar 1926. Nährlösung: H_2O 600, Dextrose 30, KNO_3 6, K_2HPO_4 1,5, $MgSO_4$ 0,7, Fe 0,06; ± 2 Proz. $CaCO_3$.

50 ccm in 250-ccm-Kolben. 25 bis 30° C.

	Frischgewichte in g	
— $CaCO_3$ — $ZnSO_4$	3,4	3,2
— $CaCO_3$ + 0,001 Proz. $ZnSO_4$	3,6	3,7
+ $CaCO_3$ — $ZnSO_4$	2,6	2,5
+ $CaCO_3$ + 0,001 Proz. $ZnSO_4$	3,1	3,2
+ $CaCO_3$ + 0,003 „ $ZnSO_4$	3,5	3,7
+ $CaCO_3$ + 0,005 „ $ZnSO_4$	4,0	4,1

Im Zusammenhang mit Zinkgehalt und Reaktion der Nährlösung steht auch die Bildung der Oxalsäure.

Butkewitsch-Orlow und *Buromsky* haben gezeigt, daß Aspergillus bei Gegenwart von Zink wenig oder keine Oxalsäure bildet. Das konnte ich bestätigen. Sobald ich meinen alkalischen Kulturlösungen optimale Mengen Zink zusetzte, konnte ich in ihnen nur noch wenig oder gar keine Oxalsäure nachweisen, während ich früher oft große Mengen davon fällen konnte. Die Bildung der Oxalsäure wird aber von anderen Autoren [*Wehmer* (1), *Brenner*, *Nikitinski*, *Butkewitsch* (1), *Sakamura*] mit der $H^{\cdot}$-Konzentration unmittelbar in Beziehung gesetzt. Nach den genannten Autoren soll in alkalischen (K_2HPO_4) und besonders auch in gepufferten ($CaCO_3$)-Lösungen deshalb viel Oxalsäure gebildet werden, weil dadurch das schädliche Alkali neutralisiert wird. Unter der Giftwirkung der Oxalsäure oder auch unter der unökonomischen Produktion derselben soll dann das Wachstum des Aspergillus leiden.

Ich erhielt auch in Nährlösungen mit $NaNO_3$ und K_2HPO_4 niemals beachtenswerte Mengen Oxalsäure, wenn die Lösungen gleichzeitig optimale Zinkmengen enthielten. Daraus muß geschlossen werden, daß die Oxalsäurebildung nicht unmittelbar, sondern mittelbar eine Funktion der zu niedrigen $H^{\cdot}$-Konzentration ist. Nicht die Alkalität ist die Ursache, sondern die dadurch hervorgerufene Verminderung der Zinkkonzentration. Zinkmangel bewirkt eine Lähmung des Stoffwechsels bei Aspergillus, was eine Anhäufung von Oxalsäure und ein Sinken des Erntegewichts zur Folge hat. Bei optimaler Zinkkonzentration kann darum auch der geringere Nährwert des Nitrats im Gegensatz zum Ammoniak nur durch eine schlechtere Verwertbarkeit (notwendige Reduktion) des NO_3-Stickstoffs begründet werden, nicht auch gleichzeitig durch eine „notgedrungene Erzeugung von Oxalsäure" (*Brenner*). Die Abhängigkeit der Oxalsäurebildung von der Zinkkonzentration legt die Vermutung nahe, daß diese von vielen Pflanzen gebildete Säure vielleicht in engerer Beziehung zum Eiweißstoffwechsel steht (*Palladin*, *Hansen*, *Schimper*, *Kostytschew*).

Aus den obigen Versuchen über Zink und $H^{\cdot}$-Konzentration geht ferner hervor, daß ich zur eingehenden biologischen Untersuchung des



Zinks eine schwach alkalische Nährlösung (K_2HPO_4) mit physiologisch-alkalischer oder neutraler N-Quelle verwenden durfte und mußte. Nur so waren die Kulturbedingungen optimal, und nur so konnte ich die Zinkverunreinigungen aus der Nährlösung an die Kohle adsorbieren.

Die Lebensnotwendigkeit des Zinks für Aspergillus niger.

Nach den Ergebnissen der folgenden beiden Versuche, die mit solchen alkalischen Nährlösungen durchgeführt wurden, mußte ich vermuten, daß Zink nicht nur förderte, sondern sogar lebensnotwendig für Aspergillus sei.

23. Versuch. 10. bis 15. Februar 1926. Nährlösungen:

A (alkalisch)	S (sauer)
H_2O 400	H_2O 400
Saccharose 20	Saccharose 20
$MgSO_4$ 0,5	$MgSO_4$ 0,5
$NaNO_3$ 5,8	NH_4NO_3 2
K_2HPO_4 1,75	KH_2PO_4 1
Fe 0,01	Fe 0,01
	K_2SO_4 0,6

Nicht mit Kohle gereinigt!

25 ccm in 100-ccm-Kolben. 25 bis 30° C.

Am 11. Februar: Von A alle gekeimt. Ansteigende Reihe der Mycelentwicklung entsprechend den steigenden Zinkgaben schon sichtbar. S kleine Mycelinselchen. Ansteigende Reihe sehr deutlich.

Am 12. Februar: Ansteigende Reihe nur noch bei A sichtbar. Hier aber allgemein schwächere Mycelien als bei S. Diese alle völlig gleich (weiß, steril), während die von A bräunlich gefärbt waren und Sporen in abfallender Reihe entsprechend steigenden Zinkgaben gebildet hatten.

Am 15. Februar: A. Mycelien bei den höheren Zinkgaben stark gefaltet mit wenig Sporen. Die unteren Glieder der Reihe glatt mit mehr Sporen. Bei 20 $ZnSO_4$ waren die Konidienträger verkümmert und die Konidien gelb. Die Lösungen waren schwach sauer und gelb bis schwach alkalisch und rot, entsprechend 0 bis 20 $ZnSO_4$. — S. Mycelien alle gleich. Nur am Rande einzelne Sporenköpfchen. Alle Lösungen schwach sauer.

mg $ZnSO_4$ pro 100 ccm	Gewichte der lufttrockenen Mycelien in g			
	A		S	
0	0,16	0,14	0,52	0,50
0,005	0,22	0,19	0,52	0,51
0,1	0,28	0,21	0,51	0,50
0,5	0,41	0,40	0,51	0,52
1	0,44	0,47	0,50	0,53
5	0,46	0,46	0,51	0,50
10	0,46	0,44	0,52	0,51
20	0,43	0,43	0,50	0,51

Diesen Versuch habe ich schon im Eisenkapitel erwähnt und auch auf den Unterschied zwischen der sauren und der alkalischen Reihe hingewiesen (12. Versuch). In der sauren Reihe wurde vielleicht deshalb ein höheres Erntegewicht erzielt, weil der Stickstoff des Ammonsalzes leichter verwertbar ist als der vom Nitrat. Daß hier das Erntegewicht nicht auch mit steigender Zinkmenge anstieg, liegt offenbar daran, daß die als Verunreinigungen vorhandenen Zinkmengen schon hinreichten, um dies Höchstgewicht zu produzieren, und daß dann entsprechend 0,5 g Erntegewicht so viel Salpetersäure frei gemacht war, daß ein Weiterwachsen unmöglich wurde (vgl. Versuche 20 und 21). Diese bestimmte Hemmungsschwelle, einer bestimmten Konzentration Salpetersäure entsprechend, wurde eben während der Kulturdauer überall erreicht. In den ersten beiden Tagen war auch in dieser sauren Reihe eine deutliche Förderung durch das Zink unverkennbar (wie in Versuche 18, 20 und 21). Eine Schädigung durch das Zink entsprechend seiner Konzentration hat auch hier nicht stattgefunden.

Die alkalische Reihe läßt aber sogar auf absolute Notwendigkeit des Zinks schließen. Es bestand daher Aussicht, daß, wenn es mir gelang, die natürlichen Zinkverunreinigungen aus der Lösung zu entfernen, der Schnittpunkt einer Zinkkurve auf der Ordinatenachse dem Nullpunkt sehr nahe kommen würde. Durch Adsorption aus alkalischer Lösung an Kohle konnte ich dieses Ziel schon fast erreichen.

24. Versuch. 26. November bis 1. Dezember 1925. Nährlösung: H_2O 700, Dextrose 35, KNO_3 3,5, K_2HPO_4 1,75, $MgSO_4$ 0,9. Mit 0,4 Proz. Kohle filtriert. ± 0,01 Proz. Fe, ± 0,001 Proz. $ZnSO_4$. 25 ccm in 250-ccm-Kolben. 30° C.

A — Fe — Zn: nur eben gekeimt. Auf dem Keimmycel viele schwarze Sporen. Lösung farblos.

A + Fe — Zn: dasselbe, aber etwas mehr Mycel. Lösung farblos.

A — Fe + Zn: wie A — Fe — Zn, aber weniger Sporen. Lösung farblos.

A + Fe + Zn: sehr starkes Mycel mit gelbbraunen Sporen. Lösung rotbraun.

	Trocken-gewichte in g		Trocken-gewichte in g
A — Fe — Zn	0,016 0,018	A + Fe — Zn	0,053 0,013
A — Fe + Zn	0,062 0,041	A + Fe + Zn	0,671 0,654

Weit besser noch glückte mir der Beweis für die Notwendigkeit des Zinks, als ich der alkalischen Lösung vor der Adsorption eine Spur

Ammoniumsulfid zusetzte, wodurch die Fällung und dementsprechend auch die Adsorption des Zinks vollkommener ist.

25. Versuch. 21. bis 26. Januar 1926. Nährlösung: H_2O 600, Dextrose 30, KNO_3 5, K_2HPO_4 2,5, $MgSO_4$ 1,2, Fe 0,06. Zum Teil mit einer Spur Ammoniumsulfid und 5 Proz. Kohle gereinigt. ± 0,0005 Proz. $ZnSO_4$.

25 ccm in 100-ccm-Kolben. 30° C.

Alle Lösungen ohne Zink farblos, mit Zink braun. Die Mycelien auf mit Kohle behandelter Lösung mit Zink hatten gelbe Sporen und waren zum Teil sehr inselig gewachsen. Die mit Sulfid und Kohle filtrierten Lösungen ohne Zink waren nur getrübt durch untergetauchten Mycelschleier. Hier kein Wachstum an der Oberfläche!

	Trockengewichte in g	
— Sulfid — Kohle — Zn	0,151	0,173
— „ — „ + „	0,370	0,365
— „ + „ — „	0,063	0,014
— „ + „ + „	0,236	0,245
+ „ — „ — „	0,062	0,077
+ „ — „ + „	0,354	0,379
kalt filtriert + „ + „ — „	0,008	0,006
„ „ + „ + „ + „	0,274	0,223
heiß filtriert + „ + „ — „	0,006	0,007
„ „ + „ + „ + „	0,302	0,297

Damit wäre also die Methode zur Reinigung der Nährlösung vom Zink gegeben und der Beweis für die Lebensnotwendigkeit des Zinks erbracht. Denn das, was ich vom Eisen sagte, gilt auch für das Zink: Die Adsorption ist nicht bis aufs letzte Atom quantitativ vollkommen, und Filter, Glas und Impfsporen geben wieder Zink an die Lösung ab. Diese Spuren ermöglichen dem Pilze Keimung und ein kaum noch wahrnehmbares Wachstum[1]). [Jenaer 20-Glas enthält praktisch kein Zink und war deshalb für diese Versuche besonders geeignet.]

Die Notwendigkeit von Eisen und Zink in saurer Lösung.

Ich habe bis jetzt gezeigt, daß Eisen und Zink in den verwendeten alkalischen Nährlösungen für Aspergillus niger notwendig sind. Das gilt aber auch, wie vorauszusehen war, für saure Lösungen.

26. Versuch. 8. bis 13. Januar 1926. Nährlösung: H_2O 100, Dextrose 5, KNO_3 0,5, K_2HPO_4 0,25, $MgSO_4$ 0,125. Mit 3 Proz. Kohle gereinigt. ± 10 mg Fe, ± 0,9 mg Zn pro 100 ccm.

50 ccm in 250-ccm-Kolben. 30° C.

Die sauren Lösungen (S) wurden durch gemeinsames Ansäuern der alkalischen Lösung (A) hergestellt. Dann erst wurden sie in die

[1]) Betreffs Zinkkurve siehe Anhang und Kurve 2. (S. 355.)

Kolben verteilt. Die Ansäuerung geschah mit Essigsäuredämpfen, die dicht über der Nährlösung aus gereinigtem Glasrohr austraten. Das Rohr tauchte nicht in die Nährlösung ein. Da ich kein Ammoniumsulfid angewendet hatte, war das Zink natürlich nicht vollkommen aus der Lösung entfernt.

	Fe	Zn	Gewichte der lufttrockenen Mycelien in g	
A	+	+	0,427	0,452
S	+	+	0,438	0,478
A	+	—	0,247	0,252
S	+	—	0,164	0,247
A	—	+	0,019	0,019
S	—	+	0,010	0,008
A	—	—	0,036	0,018
S	—	—	0,009	0,008

Der ökonomische Koeffizient in Abhängigkeit von Eisen und Zink.

Bei Mangel an Eisen und Zink sinkt der ökonomische Koeffizient. Betreffs Zink hat *Buromsky* das Gegenteil behauptet, während *Ono* und andere Forscher eine Erhöhung dieses Koeffizienten bei Zusatz von Zink feststellten.

27. Versuch. 17. bis 24. Dezember 1925. Nährlösung wie im vorigen Versuch, mit 1 Proz. Kohle gereinigt.

± 10 mg Fe, ± 0,5 mg $ZnSO_4$ pro 100 ccm.

50 ccm in 250-ccm-Kolben. 28° C.

Fe	Zn	Trockengewichte in g		Verbrauchter Zucker in Proz. (Bestimmung nach *Fehling*) *)		Der ökonomische Koeffizient: Trockengewicht / Verbrauchter Zucker **)	
+	+	0,950	0,945	3,72	3,72	0,255	0,254
+	—	0,159	0,154	0,85	1,0	0,187	0,154
—	+	0,041	0,042	1,0	1,0	0,041	0,042
—	—	0,011	0,009	1,0	0,85	0,010	0,012

*) Zu Beginn des Versuchs waren vorhanden 4,3 Proz. Dextrose.
**) Auch hier muß berücksichtigt werden, daß das Zink nicht völlig adsorbiert wurde.

Die Schwankungen im Erntegewicht in Abhängigkeit von Eisen und Zink.

Wenn man dem Pilze nicht die optimale Eisen- und Zinkkonzentration gibt, hängt die Höhe der Trockensubstanzbildung sehr vom Zufall ab. Das Glas des einen Kulturkolbens wird mehr Eisen und Zink an die Lösung abgeben als das des anderen. Auch ist es möglich, daß die Lösung, wenn sie alkalisch ist, im einen Falle mehr von den Metallen mitbekommt als im anderen. Bei unteroptimaler Konzentration haben

aber auch schon ganz geringe Unterschiede recht beträchtliche Schwankungen im Erntegewicht zur Folge.

28. Versuch. 17. bis 23 Januar 1926. Nährlösung wie bei Versuch 26. ± 0,001 Fe, ± 0,001 Proz. $ZnSO_4$.

50 ccm in 250-ccm-Kolben. 24 bis 27° C.

Es wurde überall mit der Nadel reichlich geimpft.

Trockengewichte in g				Trockengewicht in g			
+ Fe + Zn	0.855 0.871 0.899 0 897 0.903	+ Fe — Zn	0 348 0,633 0,675 0.189 0,296	— Fe + Zn	0 925 0 538 0,542 0,8 6 0,553	— Fe — Zn	0,292 0,172 0,140 0,150 0,193

Aspergillus niger und Kupfer.

Orientierende Versuche.

Die Adsorptionsmethode mit voraufgehender Sulfidfällung in alkalischer Lösung brachte noch eine weitere Aufklärung, nämlich die, daß neben Eisen und Zink auch noch die überall vorhandenen Kupferspuren aus der Nährlösung adsorbiert wurden, was eine auffällige Schädigung des Pilzes zur Folge hatte. Auf gereinigter Lösung und mit nachträglichem Zinkzusatz produzierte Aspergillus zwar durchweg ein ansehnliches Erntegewicht, aber in seinen Artmerkmalen war er offenbar schwer geschädigt. Er bildete dann nämlich keine schwarzen Sporen mehr, sondern gelbe. Der Aspergillus, den ich nun immer erntete, war nicht mehr Aspergillus *niger*. Diese Schädigung trat nicht ein, wenn es in der Lösung an Zink fehlte. Dafür war dann aber das Erntegewicht viel niedriger. *Arcichovskij* hat diese zerstörende Wirkung des Zinks auf die „Artorganisation" auch beschrieben, und dies schwerwiegende Argument hat offenbar sehr zur Verbreitung der Anschauung von der Giftigkeit des Zinks beigetragen.

Ich habe die eigenartige Erscheinung der gelben Sporen schon wiederholt erwähnt und machte diese Beobachtung zum ersten Male bei folgendem Versuch:

29. Versuch. 5. bis 15. März 1925. Nährlösung: H_2O 100, Dextrose 5, NH_4NO_3 0,5, KH_2PO_4 0,25, $MgSO_4$ 0,125, Fe 0,01, $ZnSO_4$ 0,0001.

200 ccm in 1-Liter-Kolben. 20° C.

Der Pilz bildete dicke Decken von gelber Farbe. Frischgewichte 18,3 und 15,5 g. Die Lösungen waren ebenfalls gelb. Die Sporen waren anfangs hellgelb gefärbt und wurden dann allmählich dunkler bis schwarzbraun.

Die Schädigung tritt also zuweilen auch in nicht gereinigten Kulturen auf, wenn diese größere Mengen Zink enthalten.

Die weitgehende Beseitigung des Kupfers aus der Nährlösung durch Adsorption sollte sich aber noch gefährlicher auswirken. Bei einem Versuch mit fünf Parallelen, deren schwach alkalische, ammonsulfidhaltige Lösung mit Kohle gründlich gereinigt war, und die dann alle wieder Eisen und Zink (als chemisch reine Salze) in optimaler Konzentration bekommen hatten, waren diese fünf Kulturen so schlecht gewachsen, daß ich sie — in der Annahme, irgend ein Versehen sei die Ursache — sämtlich verwerfen mußte. Meiner Schätzung nach hatten sie alle nur ungefähr halb soviel Trockensubstanz gebildet wie sonst üblich. Die Frischgewichte betrugen 1,3 bis 1,8 g statt 3,5 bis 4,5 g. Die wenigen Sporen waren außerdem ganz hell weißgelb gefärbt. Erst später wurde mir diese Erscheinung verständlich.

Zuerst dachte ich daran, ob nicht etwa auch bedeutende Mengen Magnesium und Phosphor bei der alkalischen Reaktion adsorbiert würden, überzeugte mich aber davon, daß es nicht der Fall war:

30. Versuch. 17. bis 23. Januar 1926. Nährlösung von Versuch 26. Mit 1 Proz. Kohle gereinigt. + 0,01 Proz. Fe, ± 0,001 Proz. $ZnSO_4$, ± 0,05 Proz. $MgSO_4$ (Mg), ± 0,1 Proz. K_2HPO_4 (P).

25 ccm in 100-ccm-Kolben. 24 bis 27° C.

Die mit Kohle gereinigten Kulturen ohne Zink hatten gleichviel gelbe und schwarze Sporen, die entsprechenden mit Zink hatten hellbraune bis gelbe Sporen. Die nicht gereinigten ohne Zn hatten schwarze und die entsprechenden mit Zink braune Sporen. Bei diesem Versuch muß berücksichtigt werden, daß ich die Nährlösung nicht mit Sulfid gereinigt habe.

	Gewichte der lufttrockenen Mycelien in g	
Nicht gereinigt — Zn	0.355	0,284
„ „ + Zn	0 455	0,482
Gereinigt — Zn	0.268	0 188
„ + Zn	0.392	0,374
„ + Mg + Zn	0.413	0,3[illegible]3
„ + P + Zn	0.390	0.361
„ + Mg + P + Zn	0.376	0,423

An der Höhe des Erntegewichts und an der Färbung der Sporen hatte der Zusatz von Magnesium und Phosphor nichts zu ändern vermocht. Es war also sicher, daß die Kohle tatsächlich aus der alkalischen, besonders aber aus der sulfidhaltigen Lösung irgend ein wichtiges Element herausnahm (Versuche 25 und 33), das ich bislang übersehen hatte. Um es zu bestimmen, untersuchte ich zunächst die Wirkung

22*

des Mangans, weil dieses von *Bertrand* (3) (4) und *Bertrand-Javillier* (1) (2) des öfteren als für Aspergillus ernährungsphysiologisch besonders wichtig bezeichnet wurde. Zugleich prüfte ich noch einmal auf Magnesium nd Phosphor.

31. Versuch. 6. bis 11. Februar 1926. Nährlösung: H_2O 1000, Saccharose 50, KNO_3 5, K_2HPO_4 2,5, $MgSO_4$ 1. Mit 1 Proz. Kohle gereinigt. ± 0,01 Proz. Fe, ± 0,0018 Proz. $ZnSO_4$ (ich verwendete immer chemisch reines *Mohr*sches Salz und ebensolches Zinksulfat). ± $MnSO_4$: von einer fast gesättigten Lösung 3 Tropfen pro Kolben = *Mn*.

$$\pm \left\{ \begin{array}{ll} 0{,}04 \text{ Proz.} & MgSO_4 \\ 0{,}08 \quad „ & K_2HPO_4 \end{array} \right\} = Mg,\ P.$$

Außerdem untersuchte ich auch noch die Asche des verwendeten Rohrzuckers, von der Überlegung ausgehend, daß dies Naturprodukt das gesuchte Element enthalten müsse. 10 g Saccharose wurden in Quarzschalen verascht, die Asche in wenig Schwefelsäure gelöst, die überschüssige Schwefelsäure abgeraucht und der Rückstand in wenig Aqua dest. aufgenommen. Diese Lösung wurde nach Neutralisation mit Natronlauge auf die beiden Kolben verteilt = *Asche*.

	Trockengewichte der Mycelien in g	
Nicht gereinigt + Fe + Zn	0,649	0,705
Gereinigt — Fe — Zn	0,012	0,006
„ + Fe — Zn	0,016	0,060
„ — Fe + Zn	0,036	0,022
„ + Fe + Zn	0,652	0,660
„ + Fe + Zn + *Mn*	0,670	0,669
„ + Fe + Zn + *Asche* . . .	0,878	0,837
„ + Fe + Zn + *Mg, P* . . .	0,615	0,633

Der sonst ganz beträchtliche Unterschied zwischen den gereinigten und nicht gereinigten Nährlösungen mit Eisen und Zink ist hier kaum zu erkennen, offenbar weil ich kein Sulfid angewandt hatte. Auch ist es möglich, daß die Lösung schon vor der Kohlefiltration nicht viel von dem gesuchten Element enthielt.

Eine deutliche Förderung durch Mangan war nicht zu erkennen; auch die Sporenfarbe war nach wie vor gelb. Dagegen war beim Aschenzusatz das Trockengewicht sehr merkbar gestiegen, und die Sporen dieser Kulturen waren typisch schwarz gefärbt. Der Rohrzucker (vgl. Versuch 36) enthält also das gesuchte Element, wenn auch nicht in den Mengen, daß die Nährlösung mit 5 oder 10 Proz. Zucker gleich genügend davon mitbekommt. Wenn man demnach die Zuckergabe steigert, dann nähert sich damit nicht nur die Konzentration des

Kohlenstoffs dem Optimum, sondern auch noch die mindestens *eines* anderen Faktors (siehe später). Die Erhöhung der Trockensubstanzproduktion hat somit nicht *eine*, sondern wenigstens zwei Ursachen.

Um nun endlich hinter das Geheimnis zu kommen, was eigentlich in der Zuckerasche diese Wirkung auf Aspergillus ausübte, mußte ich mehrere verschiedene Salze getrennt auf ihre Wirkung untersuchen.

Die Notwendigkeit des Kupfers zum natürlichen Gedeihen des Aspergillus niger.

In Anbetracht der Tatsache, daß gerade Sulfid die Adsorption des fraglichen Elements so sehr begünstigte (Versuche 15, 16 und 34), vermutete ich nunmehr, daß wohl in erster Linie ein Schwermetall in Frage käme und davon vor allem das Kupfer, denn das Mangan hatte ich ja bereits ausgeschieden. Dafür spricht auch die Beobachtung, daß oft schon nach Zusatz von Ammonsulfid ohne Kohlefiltration das Erntegewicht etwas sank (Versuch 34), und stets heller gefärbte Sporen gebildet wurden, was in rein alkalischer Lösung niemals in dem Maße der Fall war. Die Wirkung des gesuchten Elements war also zum Teil schon allein durch den Sulfidzusatz aufgehoben. Bedenkt man, daß Kupfersulfid in verdünnten Säuren praktisch unlöslich ist — der Pilz bildet ja Säuren, die wohl Zinksulfid, nicht aber Kupfersulfid lösen können —, so ist das ganz erklärlich.

32. Versuch. 15. bis 20. Februar 1926. Nährlösung wie in Versuch 31. Mit einer Spur $(NH_4)_2S$ und 5 Proz. Kohle gereinigt. + 0,01 Proz. Fe, ± 0,001 Proz. $ZnSO_4$.

Ferner: ± Si als je 1 Tropfen Wasserglas,
± 0,0001 Proz. Cu als $CuSO_4$,
± 0,01 „ Mn „ $MnSO_4$,
± 0,0001 „ Al „ $Al_2(SO_4)_3$,
± 0,00005 „ Cd „ $Cd(NO_3)_2$,
± 0,0001 „ Co „ $CoCl_2$,
± 0,0005 „ Hg „ $HgCl_2$,
± 0,00005 „ As „ As_2O_3.

Diese Salze waren nicht chemisch rein und wurden in Aqua dest. gelöst zugesetzt. Dadurch wurde die Nährlösung natürlich wieder mehr oder weniger mit Zink verunreinigt, besonders beim Mangansulfat.

50 ccm in 250-ccm-Kolben. 25 bis 30° C.

Ohne Kohlefiltration: + Zn: gelbe Sporen mit wenig schwarzen gemischt.
Mit „ + Zn: gelbe Sporen.
„ „ + Zn + Cu: schwarze Sporen.

Alle übrigen: gelbe bis hellbraune Sporen.

	Trockengewichte in g	
Ohne Kohlefiltration + Fe + Zn	0,717	0,613
Mit „ + Fe + Zn	0,613	0,590
„ „ + Fe + Zn + Cu	0,765	0,750
„ „ + Fe + Zn + Si	0,549	0,331
„ „ + Fe + Zn + Mn	0,543	0,501
„ „ + Fe + Zn + Al	0,563	0,564
„ „ + Fe + Zn + Cd	0,447	0,464
„ „ + Fe + Zn + Co	0,538	0,584
„ „ + Fe + Zn + Hg	0,547	0,515
„ „ + Fe + Zn + As	0,540	0,534
„ „ + Fe — Zn + Cu	0,030	0,079
„ „ + Fe — Zn + Si	0,023	0,027
„ „ + Fe — Zn + Mn	0,070	0,123
„ „ + Fe — Zn + Al	0,028	0,060
„ „ + Fe — Zn + Cd	0,000	0,000
„ „ + Fe — Zn + Co	0,041	0,055
„ „ + Fe — Zn + Hg	0,043	0,041
„ „ + Fe — Zn + As	0,069	0,071

Diese Zahlen lehren, daß Eisen und Zink allein nicht genügen, um die höchsten Ernten zu erzeugen. Ein Höhepunkt des Wachstums wird erst bei Gegenwart von Kupfer erreicht. Die augenscheinlich größte Bedeutung des Kupfers aber liegt darin, daß es allein imstande ist, die typische Schwarzfärbung der Konidien hervorzurufen.

Aus der Tabelle ist noch mehr zu ersehen: Das Kupfer kann durch keines der anderen angeführten Elemente ersetzt werden. Auch die Funktion des Zinks ist spezifisch; es kann ebenfalls nicht ersetzt werden, auch nicht durch Kupfer oder Cadmium (*Lepierre*). Eine fördernde Wirkung des Arsens, wie sie *Orlowski* beobachtet hat, konnte ich nicht feststellen. Ich muß dabei aber erwähnen, daß auch von einer Wirkung des Quecksilbers (*Butkewitsch-Orlow*) in der Tabelle nichts zu sehen ist, obwohl ich früher selber einmal eine deutliche Förderung durch Quecksilber beobachten konnte (Versuch 32a).

Versuch 32a. 6. bis 10. Oktober 1925. Nährlösung: H_2O 100, Saccharose 5, NH_4NO_3 0,5, KH_2PO_4 0,25, $MgSO_4$ 0,125.
25 ccm in 100-ccm-Kolben. 25° C.

mg $HgCl_2$ pro 100 ccm	Frischgewichte in g		mg $HgCl_2$ pro 100 ccm	Frischgewichte in g	
0	0,6	0,4	0,005	0,6	0,7
0,00005	0,6	0,6	0,025	0,9	0,9
0,0001	0,6	0,5	0,125	1,0	1,1
0,001	0,6	0,6	0,625	1,3	1,6

Die letzte Konzentration entspricht ungefähr derjenigen von Versuch 32. Der Unterschied zu diesem Versuch liegt darin, daß hier bei Versuch 32a die Nährlösung nicht mit Kohle behandelt, ihr kein Eisen und Zink zugesetzt wurde und die Stickstoffquelle eine andere war. Außerdem war bei diesem Versuch die H-Konzentration viel größer. Weshalb das Quecksilber in Versuch 32a stimuliert hat und in Versuch 32 nicht, ist mir vorläufig unverständlich[1]).

Über die außerordentlich geringe Optimalkonzentration des Kupfers gibt der folgende Versuch Auskunft, der zugleich auch zeigen soll, wie das Kupfer in allen natürlichen Medien enthalten ist und hier wirkt.

33. Versuch. 20. bis 26. Februar 1926. Nährlösung wie in Versuch 31. Mit einer Spur $(NH_4)_2S$ und 1 Proz. Kohle gereinigt.

+ 0,01 Proz. Fe, + 0,002 Proz. Zn, ± 0,00005 Proz. $CuSO_4$, ± 0,0005 Proz. $CuSO_4$, ± Saccharose-Asche, ± Erdextrakt-Asche.

Zuckerasche (vgl. Versuch 34): 10 g Saccharose verascht. + H_2SO_4. H_2SO_4 abgeraucht. + H_2O, + KOH bis eben alkalisch. Diese Lösung in zwei gleiche Teile:

a) so auf die beiden Parallelen verteilt,
b) zuvor mit $(NH_4)_2S$ und Kohle gereinigt.

Erdasche: Extrakt eingedampft und genau so behandelt.

25 ccm in 100-ccm-Kolben. 25 bis 30° C.

Nicht gereinigt:	gelbe Sporen mit wenig schwarzen gemischt.
Gereinigt:	gelbe Sporen.
„ + Cu	schwarze Sporen.
„ + Zuckerasche a)	schwarze Sporen.
„ + „ b)	gelbe Sporen.
„ + Erdasche . . a)	schwarze Sporen.
„ + „ b)	gelbe Sporen.

	Trockengewichte in g	
Nicht gereinigt	0.448	0.462
Gereinigt	0,291	0.303
„ + 0.00005 Proz. $CuSO_4$	0.427	0.447
„ + 0.0005 Proz. $CuSO_4$	0.405	0 456
„ + Zuckerasche a	0 461	0 461
„ + „ b	0,313	0.341
„ + Erdasche a	0.479	0 494
„ + „ b	0,351	0,347

[1]) Es stellte sich nachträglich heraus, daß in dem Brutzimmer, in dem die Kulturen standen, Quecksilber auf dem Fußboden verschüttet war, so daß sogar eine Vergiftung einiger Institutsangehöriger eingetreten war. Es wäre durchaus möglich, daß die Unwirksamkeit des Quecksilbers beim zweiten Versuch auf den Gehalt der Luft daran zurückzuführen wäre.

Die Optimalkonzentration des Kupfers liegt also nicht über 0,00005 Proz. $CuSO_4$[1]). Es ist klar, daß unter diesen Umständen es sehr schwer sein dürfte, das Kupfer so weitgehend aus der Lösung zu entfernen, daß, wenn es auch lebensnotwendig sein sollte, der Pilz nicht mehr imstande wäre, zu wachsen. Die Frage, ob das Kupfer auch zu den lebensnotwendigen Elementen zu zählen ist, muß also vorerst noch unentschieden bleiben.

Über die Möglichkeit, daß noch andere Aschenelemente für die Wachtumsgröße des Aspergillus niger wichtig sind.

Bei genauerer Betrachtung der obigen Zahlen fällt die bemerkenswerte Tatsache auf, daß mit dem qualitativ unbekannten Aschenrückstand von Erde ein noch höheres Erntegewicht erzielt wird als mit Kupfer allein. Außerdem sinkt die Zahl nach Zusatz der durch Adsorption gereinigten Lösungen der betreffenden Aschensalzgemische nicht wieder auf den ursprünglichen Wert 0,3, sondern auf 0,35. Das ist sehr wichtig und soll in dem nächsten Versuch noch deutlicher gezeigt werden.

34. Versuch. 25. Februar bis 1. März 1926. Nährlösung: H_2O 1000, Saccharose 100, $NaNO_3$ 10, K_2HPO_4 2,5, $MgSO_4$ 1,25. Zum Teil mit einer Spur Ammoniumsulfid und 1 Proz. Kohle gereinigt.

± 0,01 Proz. Fe, ± 0,0008 Proz. Zn, ± 0,0003 Proz. Cu, ± 0,0025 Proz. Cu.

Als Zusätze ferner:

1. Je Kolben Asche von 5 g Saccharose als Sulfat (hergestellt, wie im vorigen Versuch beschrieben) = *Zucker*.
2. Je Kolben Asche von 50 ccm Würze als Sulfat (ebenso hergestellt) = *Würze*.
3. Je Kolben Asche von 2,5 g *Merck*scher Blutkohle als Sulfat (ebenso hergestellt) = *Blut*.
4. Eine leere, schon oft benutzte Quarzschale wie die anderen Veraschungsschalen (ebenfalls Quarz), und die resultierende Lösung wie die anderen Lösungen behandelt = *Quarz*.

Diese nachträglich zugesetzten Lösungen wurden vorher mit KOH schwach alkalisch gemacht.

Nur die mit Sulfid gereinigten Lösungen erhielten die obigen Kupfer- und Aschenzusätze. 25 ccm Nährlösung ohne obige Zusatzlösung in 100-ccm-Kolben. 25 bis 30° C.

---

[1]) Siehe Anhang. (S. 355.)

Versuchsergebnis. Unerklärlich ist es, daß eine Parallele von — Sulfid + Kohle — Fe — Zn überhaupt nicht gekeimt war.

— Sulfid — Kohle + Fe + Zn: schwarze Sporen mit ganz wenig braunen gemischt.
+ „ — „ + Fe + Zn: hellbraune Sporen.
— „ + „ + Fe + Zn: „ „
+ „ + „ + Fe + Zn: hellgelbe Sporen.
+ „ + „ + Fe + Zn + *Quarz*: hellbraune Sporen.
+ „ + „ + Fe + Zn + Cu: schwarze „
+ „ + „ + Fe + Zn + *Zucker*: „ „
+ „ + „ + Fe + Zn + *Würze*: „ „
+ „ + „ + Fe + Zn + *Blut*: „ „

Je größer das Gewicht, um so brüchiger war das Mycel.

	Trockengewichte in g	
— Sulfid — Kohle + Fe + Zn	0,534	0,522
+ „ — „ + Fe + Zn	0,494	0,504
— „ + „ — Fe — Zn	0,011	0,000
— „ + „ + Fe — Zn	0,031	0,028
— „ + „ — Fe + Zn	0,040	0,033
— „ + „ + Fe + Zn	0,511	0,464
+ „ + „ — Fe — Zn	0,006	0,018
+ „ + „ + Fe — Zn	0,029	0,030
+ „ + „ — Fe + Zn	0,044	0,059
+ „ + „ + Fe + Zn	0,458	0,469
+ „ + „ + Fe + Zn + 0,0003 Proz. Cu	0,595	0,601
+ „ + „ + Fe + Zn + 0,0025 Proz. Cu	0,600	0,490
+ „ + „ + Fe + Zn + *Quarz*	0,582	0,578
+ „ + „ + Fe + Zn + *Zucker*	0,648	0,656
+ „ + „ + Fe + Zn + *Würze*	0,771	0,738
+ „ + „ + Fe + Zn + *Blut*	0,793	0,761

Es sei besonders erwähnt, daß die Kohle nur eine kaum bemerkbare Menge braunroter (Fe_2O_3) Asche ergab, so daß also diese außerordentlich fördernde Wirkung nicht durch schon bekannte Aschensalze (Mg, K, P) hervorgerufen sein kann. (Nach Angabe der Firma E. Merck beträgt der Aschengehalt ihrer Carbo medicinalis nur 1 bis 3 Proz.).

Während ich mit Hilfe von Kupfer das Trockengewicht nur von 0,5 auf 0,6 g erhöhen konnte, gelang es mir, dieses mit *Würze* und *Blut* bis auf nahezu 0,8 g zu bringen. Welches in diesen natürlichen Salzgemischen die wirksamen Faktoren sind, will ich später versuchen, mit Hilfe einer abgeänderten Fällungs- und Adsorptionsmethode zu ermitteln. Die Wirkung des Kupfers durch größere Gaben zu steigern, ist jedenfalls nicht möglich, denn das eine der betreffenden Mycelien war durch 0,0025 Proz. Cu schon stark geschädigt.

Die Tatsache, daß Aspergillus auf Würze meist sehr viel besser wächst als auf reiner Zuckerlösung, ist auch sicher nicht nur durch die quantitative und qualitative Beschaffenheit der Kohlenstoffquelle bedingt, sondern auch dadurch, daß der Pilz auf Würze im Gegensatz zur Zuckerlösung ein natürlicheres, optimaleres Gemisch der für ihn wichtigen Aschensalze vorfindet.

III. Die Wirkung von Eisen, Zink und Kupfer auf sonstige Stoffwechselvorgänge bei Aspergillus niger.

Die Sporenbildung.

Ich habe schon eingangs bei den orientierenden Versuchen über Eisen erwähnt, daß ich auf den anfangs verwendeten sauren Lösungen höhere Erntegewichte erzielte, wenn ich diese mit Kohle filtrierte und ihnen nachträglich wieder Eisen zusetzte. Aber diese Mycelien blieben gewöhnlich ganz steril. Es ist das in erster Linie eine Wirkung des Zinks (aus der Kohle) und mittelbar dann auch eine solche der H˙-Konzentration. Deutlich trat das bei folgendem Versuch in Erscheinung:

35. Versuch. 20. bis 28. September 1925. Nährlösung: H_2O 100, Dextrose 5, $(NH_4)_2SO_4$ 0,5, KH_2PO_4 0,25, $MgSO_4$ 0,125. 25 ccm in 100-ccm-Kolben. 25 bis 30° C.

mg Fe und Zn pro 100 ccm	Gewicht der lufttrockenen Mycelien g	Sporen
— Fe — Zn	0.25	ziemlich viel
— Fe + 0.02 Zn	0.54	weniger
— Fe + 0,2 Zn	0.78	nur am Rande
0,1 Fe — Zn	0.24	viel
0,1 Fe + 0.02 Zn	0,62	weniger
0,1 Fe + 0,2 Zn	0,81	nur am Rande
10 Fe — Zn	0,77	dicker Rasen
10 Fe + 0.02 Zn	0.93	weniger
10 Fe + 0,2 Zn	0,74	fast keine

Daß das Zink die Hauptursache dieser Sterilität ist, geht aus einem Versuch mit alkalischer Lösung hervor.

36. Versuch. 14. bis 22. Februar 1926. Nährlösung: H_2O 1600, Saccharose 80, Harnstoff 8, K_2HPO_4 3, $MgSO_4$ 2, Mit 1 Proz. Kohle gereinigt.

$\pm$ 0,000001 Proz. Fe,

$\pm \left\{ \begin{matrix} 0,01 \\ 1 \\ 5 \end{matrix} \right\}$ mg $ZnSO_4$ pro 100 ccm

200 ccm in 1-Liter-Kolben. Nicht sterilisiert. 25 bis 30° C.

Diesen Versuch hatte ich zu einem anderen Zweck angesetzt und werde ihn später noch erwähnen. Er war aber auch betreffs Sporenbildung lehrreich:

— Fe — Zn:	zartes, schleierförmiges Mycel mit wenig Sporen.
— Fe + Zn:	dünnes Mycel mit sehr wenig Sporen.
+ Fe — Zn:	schwarz von Sporen. Hautdünnes Mycel.
+ Fe + 0,01 Zn:	Mycel dicker. Sporen etwas weniger.
+ Fe + 1 Zn:	Mycel dick. Wenig Sporen.
+ Fe + 5 Zn:	Mycel dick. Fast gar keine Sporen.

Also bei hoher Zink- und niedriger Eisenkonzentration starkes vegetatives Wachstum und geringe oder gar keine Fruktifikation. Diese Erscheinung ist vielleicht auch ein Argument dafür, daß Zink in Beziehung zum Eiweißstoffwechsel steht. Das Zink drängt den N-Stoffwechsel in den Vordergrund, wodurch immer — auch bei höheren Pflanzen — die Fruktifikation zurückgedrängt wird (Gesetz von *Klebs*). Viel Zink wirkt also in dieser Beziehung genau so wie viel Stickstoff, und die Zinkwirkung kommt besonders dann stark zur Geltung, wenn eine besonders gute N-Quelle reichlich vorhanden ist. Umgekehrt ist die Wirkung bei hoher Eisen- und geringer Zinkkonzentration. Dann ist das vegetative Wachstum weniger stark, und das dünne Mycel ist über und über mit Sporen bedeckt. Das Eisen steigert die Atmung und muß damit auch den C-Stoffwechsel steigern und so die Bedingung für eine reichliche Fruktifikation schaffen.

Die Sporenbildung ist also abhängig von Eisen *und* Zink und nicht von Eisen oder Zink allein.

Diese Beziehung zwischen der Sporenbildung und dem Eisen und Zink haben schon die französischen Forscher *Linossier* (1) (2), *Javillier-Sauton* und *Sauton* (1) geahnt. Auch *Richards* hat Unterdrückung der Sporenbildung durch Zinkzusatz festgestellt. Während *Linossier* behauptet hatte, das Eisen bewirke die Bildung des schwarzen Sporenfarbstoffs und somit auch der Sporen selbst, behaupteten *Javillier-Sauton*, daß nicht das Fehlen des Eisens, sondern die Gegenwart des Zinks die Ursache für das Ausbleiben der Sporen sei. Das Zink wirke besonders bei schlechter Ernährung des Pilzes, was ja beim Eisenmangel der Fall sei. Dem Zink maßen die Forscher eine größere Bedeutung bei als dem Eisen, weil sie in „eisenfrei" aufgewachsenen Mycelien mit Rhodan kein Eisen mehr nachweisen konnten.

Die Sporenfarbe.

Wie der Name des Pilzes besagt, sind seine Sporen für gewöhnlich schwarz gefärbt. Diesen Farbstoff hat *Linossier* (1) „Aspergillin" genannt und ihn mit dem Hämatin der Tiere verglichen, weil er ziemlich viel Eisen enthalten und Sauerstoff binden soll. Vor allem bei seiner Bildung absorbiere das Aspergillin sehr viel Sauerstoff. Worauf das beruht, werde



ich zeigen. Früher hatte man das Aspergillin sowie auch noch andere schwarze Pilzfarbstoffe (Sporen der Brandpilze) als Humine angesehen (*Lucas*). Neuerdings aber neigt man mehr zu der Annahme, solche dunklen Farbstoffe seien Anthrachinonderivate (*Czapek*). Für das Aspergillin trifft jedenfalls, wie ich zeigen konnte, die frühere Annahme zu.

37. Versuch. Von mehreren sporenreichen Mycelien schwemmte und tupfte ich die Sporen mit H_2O ab, setzte eine Spur Kalilauge zu, verrieb mit Quarzsand und filtrierte. Das Filtrat war braunrot gefärbt. Mit Salzsäure flockte dieser Farbstoff in braunschwarzen, voluminösen Massen aus, die sich mit ganz wenig Alkali oder Ammoniak wieder braunrot lösten. Die nach der Fällung restierende Flüssigkeit war schwach gelb. Eine größere Menge dieses ausgefällten und gut gewaschenen Niederschlags löste sich schon auf Zusatz einer außerordentlich geringen Menge Natronlauge, so daß ich den Vorgang als Peptisation ansprechen mußte. In dem braunen Niederschlag lag also offenbar ein Kolloidgel vor, das durch Natronlauge peptisiert wurde.

38. Versuch. Eine sporenreiche, schwarze Decke rieb ich zunächst mit 96proz. Alkohol ab und filtrierte. Filtrat rotbraun *1.*

1. Rückstand + H_2O. Filtrat rotbraun *2.*
2. Rückstand + NH_3-Wasser. Filtrat rotbraun *3.*

Es blieb ein schwarzer dritter Rückstand, der sich auch nicht in Alkali löste.

1. + HCl: Allmählich (nach Zusatz von etwas H_2O schneller) Trübung und Absetzen eines braunen, typisch huminen Niederschlags. Die überstehende Flüssigkeit war stark gelb gefärbt. Ein anderer Teil wurde verdunstet und dann in H_2O aufgenommen. Hierin löste sich nicht alles. Das übrige ging zum Teil wieder nur in Alkohol über. Der Rest blieb ungelöst. Die H_2O-Lösung verhielt sich gegen HCl wie die alkoholische Lösung.

2. Mit HCl sofort braune, humine Flocken. Filtrat völlig farblos.

3. + HCl: Wie *2.* Filtrat völlig farblos.

Die Farbe und die Art der Fällung dieser Extrakte sind genau dieselben wie beim Erdhumus. Deshalb scheint für diese Fraktionen des schwarzen Konidienfarbstoffs auch nur die Bezeichnung „Humine" angebracht, ein Ausdruck, der über die Chemie dieser Stoffe allerdings auch nichts aussagt. Die unterschiedlichen Eigenschaften betreffs Löslichkeit und Fällung lassen sich vielleicht zum Teil durch Annahme verschiedener Teilchengrößen erklären. Wären diese Körper noch Anthrachinone, dann würden sie sich betreffs Löslichkeit etwas anders verhalten:

39. Versuch. Eine Peptisation des schwarzen Materials mit NaOH wurde mit HCl gefällt und viermal mit H_2O gewaschen. Der Rückstand löste sich nicht in H_2O, Alkohol, Aceton oder H_2SO_4, wohl aber in H_2O, dem eine minimale Spur NaOH zugesetzt war.

Dieser schwarzbraune, voluminöse Niederschlag ist gewiß nichts anderes als jene noch nicht näher bekannten Stoffe, die man „Humussäuren" nennt.

Das Filtrat der Fällung war gelb gefärbt. Der Niederschlag wurde wieder in NaOH gelöst und abermals gefällt. Nach dieser Elimination des gelben, nicht fällbaren Anteils war das Filtrat völlig farblos. Auch bei der Fällung eines Erdhumusextraktes bleibt das Filtrat immer schwach gelb gefärbt. Diese Fraktion scheint das zu sein, was sich in Alkohol löst. Natürlich gibt es zwischen diesen Stufen verschiedener Teilchengröße Übergänge.

Die Lösungs- und Fällungsverhältnisse der verschiedenen Huminanteile sind sehr kompliziert.

40. Versuch. Eine rotbraune alkoholische Lösung von „Aspergillin" gab mit HCl eine geringe braune Fällung. Das rotbraune Filtrat zeigte nach NaOH-Zusatz tiefgrüne Fluoreszenz. Zugleich entstand ein Niederschlag, der sich in H_2O löste und darin nunmehr mit HCl quantitativ gefällt werden konnte. Das alkoholische Filtrat wurde auf dem Wasserbad nach Zusatz von wenig H_2O so lange eingedampft, bis sich der ganze Alkohol verflüchtigt hatte. Hierbei trübte sich die stark eingedickte Lösung. Auf Zusatz von HCl entstand ein dicker Niederschlag in dem Maße, wie CO_2 entwich, die von der NaOH absorbiert war (die Lösung hatte einen Tag gestanden). Dann ließ ich das Ganze wieder einen Tag stehen und pipettierte dann die überstehende gelbe Lösung ab. Dabei entwich der Rest CO_2, die Farbe ging von Gelb in Braun über, und feine schwebende braune Flöckchen fielen aus. Es scheint also, als ob diese Huminfraktion durch adsorptiv gebundene CO_2 in der sauren Lösung vor dem Ausflocken geschützt wird.

Linossier hatte das „Aspergillin" analysiert und viel Eisen gefunden und glaubte deshalb, den Stoff als eine einheitliche Eisenverbindung ansprechen zu müssen. Da aber der schwarze Sporenfarbstoff gemäß obiger Versuchsresultate ein kolloides Gemenge verschiedener Huminsubstanzen ist, so wird wahrscheinlich die Gesamtmenge des Eisens nicht chemisch, sondern adsorptiv gebunden sein, wie auch Erdhumus viel solches Eisen enthält.

41. Versuch. Durch ein Filter mit gut gewaschenem Aspergillinhumus saugte ich eine Eisenchloridlösung, die sich vorher mit HCl, H_2O_2 und NH_4SCN kräftig rot färbte. Nach der Filtration gab diese Lösung mit Rhodan gar keine Färbung mehr. Also war alles Eisen adsorbiert.

Ich sehe folglich im Aspergillin von *Linossier* nichts anderes als ein Gemenge von verschieden stark humifizierten Substanzen.

Was ist aber bei Aspergillus niger der Vorgang der Humifizierung und was kommt als Ausgangsstoff in Frage? Ich habe bewiesen, daß der schwarze Sporenhumus nur bei Gegenwart von Kupfer gebildet wird. Ohne Kupfer bleiben die Sporen gelb, während sie bei unteroptimaler Kupferkonzentration allmählich von gelb bis schwarzbraun nachdunkeln (Versuch 29), oder auch Mischungen von gelben und



schwarzen Sporen entstehen. Das Kupfer katalysiert also die Humifizierung, die zur Bildung fällbarer, schwarzbrauner Humussäuren führt. Ganz analoge Vorgänge spielen sich in der Nährlösung ab (siehe nächstes Kapitel). Schon *Milburn* hat vermutet, daß zwischen der gelben Farbe in der Lösung und dem Sporenfarbstoff Beziehungen bestehen. Solche Zusammenhänge konnte ich tatsächlich nachweisen. Bei unteroptimaler Eisen- und Kupferkonzentration wird nämlich in stickstoff- und zinkreichen Nährlösungen ein schöner Farbstoff gebildet der offenbar durch Kupfer in mit Salzsäure fällbare schwarzbraune Humussäuren und durch Eisen in nicht fällbare, gelbe Humine verwandelt wird.

Dieser Farbstoff steht also in enger Beziehung zur Humifizierung und kommt vielleicht auch als Ausgangsstoff hierfür in Frage. (Nach *Adler-Wiechowski* bilden sich Humine in alkalischer Lösung nur aus zyklischen Körpern.) Den Vorgang der Humifizierung selbst könnte man sich so vorstellen, daß diese beim Eiweißabbau entstehenden zyklischen Körper sich bei gleichzeitiger Oxydation vermittelst Kupferkatalyse kondensieren [*Wertheimer* [1])]. So entstehen wahrscheinlich die mit Salzsäure fällbaren Humussäuren des Aspergillins, während die Bildung der gelben, nicht fällbaren Humine offenbar vom Eisen katalysiert wird. Auf diese Weise dürfte vielleicht auch die Entstehung eines Teiles von Erdhumus zu erklären sein.

Am Schluß dieses Kapitels möchte ich noch auf folgendes hinweisen: *Wehmer* hat schon die Forderung erhoben, die hell gefärbten Aspergillusarten dem Aspergillus niger als Spezies anzugliedern. Zu derselben Ansicht kommt *Schiemann*. Sie faßt die braunen oder gelben Arten als Farbmutanten auf. Den schon bestehenden ochraceus und ostianus fügt sie die neuen Spezies fuscus und cinamomeus hinzu. Die Häufigkeit der Entstehung solcher Mutation wurde durch „starke Reize" gesteigert. Zuweilen traten auch Rückschläge auf (Modifikationen). Ich vermute, daß bei dieser Mutations- und Modifikationsbildung auch Zink und Kupfer eine Rolle gespielt haben. Alle derartigen Beschreibungen hellfarbiger Aspergillusrassen müßten auf diesen neuen Gesichtspunkt hin kritisch geprüft werden; ein gleiches gilt auch von der Arbeit von *Jaenicke.*

Die Farbe der Nährlösung.

Ähnliche Verhältnisse wie die eben beschriebenen kehren bei der verschiedenartigen Färbung der Nährlösung wieder.

---

[1]) Erst bei Drucklegung der Arbeit konnte ich die Literatur über Humusstoffe näher einsehen und mußte feststellen, daß auch *Fuchs* (*Margosches* und *Fuchs*, „Über Naturprodukte", Dresden und Leipzig 1923), *Eller* und *Koch* (Ber. d. deutsch. chem. Ges. **58**, 1490, 1919), *Schrader* (Brennstoffchemie **3**, 161, 1922) und *Höfer von Heimhalt* (Naturwissensch. **10**, 113, 1922) auf ganz anderen Wegen zur Überzeugung gelangt sind, daß die Humusstoffe durch oxydative Kondensation von zyklischen Körpern entstehen.

Der Pilz färbt saure Zuckerlösungen gewöhnlich gelb. Von diesem Farbstoff löste sich manchmal ein geringer Teil in Äther, meistens aber nicht. Mit Salzsäure wurde die gelbe Farbe zuweilen etwas dunkler, momentan entstand aber kein Niederschlag. Erst nach längerem Stehen setzte sich oft ein geringer brauner Niederschlag ab. Dieser nicht ätherlösliche Teil war in Alkohol löslich. Das war also offensichtlich das schon beschriebene, nicht fällbare Humin mit einer geringen Beimischung von fällbaren Humussäuren.

Setzte ich nun aber das erwachsene Mycel von der inzwischen stark sauer gewordenen Nährlösung auf eine reine Aschensalzlösung mit Kaliumnitrat ohne Zucker, dann sezernierte das Mycel in diese Lösung einen schmutzig rotvioletten Farbstoff in geringer Menge, der mit Salzsäure in leuchtend gelb umschlug. Zucker stand dem Pilz bei Bildung des Körpers nicht zur Verfügung. Er mußte also wohl ein Eiweißspaltprodukt sein. Dieser ätherlösliche Farbstoff wurde vom Pilz in sehr großen Mengen gebildet, wenn die Nährlösung reichlich Zink, wenig Eisen, keinen Kupferzusatz und außerdem sekundäres Phosphat, wenig Zucker und viel Stickstoff enthielt. Die Nährlösung war dann nach mehreren Tagen schmutzig violett gefärbt. Mit Salzsäure schlug die Farbe in goldgelb um und ließ sich dann mit Äther ausschütteln, wodurch der Farbstoff von den Huminen gereinigt wurde. Unterschichtete ich die gelbe Ätherlösung mit schwach alkalischem Wasser und schüttelte durch, dann trat der Farbstoff mit braunvioletter Farbe in das Wasser über. In diesem Ätherextrakt sind außer dem Farbstoff noch „huminartige" Stoffe. Nach Eindunsten des Äthers und Aufnahme in wenig Wasser mit NaOH fallen diese Stoffe bei Zusatz von Alkohol aus. Der Farbstoff bleibt dann rein leuchtend violett in der Lösung.

Daß dieser schön gefärbte Stoff tatsächlich im Verlauf der Eiweißspaltreaktionen entsteht, geht auch noch aus folgendem hervor: Zunächst ist die N-Quelle in ihrer Quantität sowohl wie in ihrer Qualität ausschlaggebend. So erhielt ich schon in nicht gereinigter saurer Lösung und ohne Zinkzusatz den hier gelb erscheinenden Farbstoff, wenn die Stickstoffquelle ausgiebig war (Asparagin). Gab ich außerdem auch noch Zink, so war die Bildung dieses Farbstoffes viel stärker, die Nährlösung wurde alkalisch und färbte sich tief rotbraun (Gemisch von dem nunmehr violett erscheinenden Farbstoff mit Huminen). Da die Eiweißatmung erst gegen Ende des Wachstums, wenn der Zucker bereits verbraucht ist, stark in Erscheinung tritt, so entstehen auch Farbstoff und Humine erst nach einiger Zeit.

42. Versuch. 30. April bis 11. Mai 1925. Nährlösung: H_2O 100, Dextrose 5, NH_4NO_3 0,5, KH_2PO_4 0,25, $MgSO_4$ 0,125, Asparagin 2, *Mohr*sches Salz Spur.

50 ccm in 250-ccm-Kolben. 25 bis 30° C.

Die sauren Lösungen wurden auf dem Wasserbad eingedampft, mit verdünnter Salzsäure wieder aufgenommen und filtriert. Zucker war nicht mehr vorhanden. Das Asparagin veränderte sich dabei nicht.

Tag der Ernte	Menge des HCl-Niederschlags	Farbe des Filtrats	Tag der Ernte	Menge des HCl-Niederschlags	Farbe des Filtrats
2. V.	wenig	schwach gelb	7. V.	viel	gelb
4. V.	mehr	gelb	11. V.	„	stark gelb



Etwas Eisen ist zur Bildung des Farbstoffs natürlich ebenfalls notwendig, wenngleich dieser dann auch leicht von überschüssigem Eisen zu Humin oxydiert wird. Ein N-Produkt der Eiweißatmung ist das Ammoniak. Das Auftreten des Farbstoffs muß also mit dem des Ammoniaks zeitlich ungefähr zusammenfallen. Einige Versuche, die dieses sowie die Abhängigkeit der Farbstoffbildung von der Zeit und vom Eisengehalt demonstrieren, seien hier angeführt:

43. Versuch. 26. Mai bis 2. Juni 1925. Nährlösung: H_2O 100, Dextrose 5, KNO_3 0,5, Asparagin 1, KH_2PO_4 0,25, $MgSO_4$ 0,125, Fe als Spur *Mohr*sches Salz, $ZnSO_4$ 0,0002.

200 ccm in 2-Liter-Kolben. 25 bis 30° C.

Datum	Farbe der Nährlösung	Reaktion d Nährlösung	*Nessler*	*Fehling*
28. V.	farblos			
29. V.	schwach gelblich	schwach sauer	ganz schwach positiv	positiv
30. V.	schwach braunrot	schwach alkalisch	positiv	negativ
31. V.	braunrot	„ „	„	„
1. VI.	rot	„ „	stark positiv	„
2. VI.	stark rubinrot			

44. Versuch. 29. Mai bis 2. Juni 1925. Nährlösung: H_2O 100, Dextrose 5, Asparagin 3, KH_2PO_4 (S) bzw. K_2HPO_4 (A) 0,25, $MgSO_4$ 0,125, $\pm$ Fe 0,001, $ZnSO_4$ 0,0002.

100 ccm in ½-Liter-Kolben. 30° C.

Am 1. Juni war die Farbe der Nährlösung bei

A + Fe gelb,
A — Fe schwach grüngelb,
S + Fe etwas weniger gelb als bei A + Fe und bei
S — Fe grüngelb.

Am 2. Juni:

	A — Fe	S — Fe	A + Fe	S + Fe
Farbe der Nährlösung .	grüngelb	gelbgrün	braun	braun
Reaktion der Nährlösung	sauer	schw. alkal.	schw. alkal.	schw. alkal.
Fehling	positiv	Spur	negativ	negativ
Nessler	schwach	positiv	stark	stark

Nach einigen weiteren Tagen waren A — Fe und S — Fe beide alkalisch und rot gefärbt, nach Ansäuern mit HCl gelb. Diese gelbe Farbe ging fast vollkommen in Äther über. Die schwach alkalischen Lösungen wurden auf dem Wasserbad eingedampft und in alkalischem Wasser wieder aufgenommen: braunrote Lösung. + HCl: gelbbraun. Hiervon löste sich nur noch ganz wenig in Äther. In Alkohol löste sich alles. Durch das Erhitzen war also offenbar der ätherlösliche Farbstoff in alkohollösliches Humin verwandelt worden.

Bei der üblichen N-Konzentration wird in alkalisch gewordenen Nährlösungen immer ein Gemenge des Farbstoffs mit Huminen gebildet, das dann je nach dem Humingehalt rubinrot oder braunrot aussieht. Die Intensität der gesamten Farbstoffbildung ist abhängig von der $H^{\cdot}$-Konzentration. In sauren Lösungen ist die Färbung nur schwach und wird fast nur durch braungelbes Humin hervorgerufen, während alkalische Lösungen stark gefärbt sind (dunkelrot bis violett) und meist noch unzersetzten Farbstoff enthalten. Es genügt schon der Kalkgehalt des Göttinger Brunnenwassers, um die Bildung des Farbstoffs und der Humine zu fördern:

45. Versuch. 30. Januar bis 3. Februar 1925. Nährlösungen: S Aqua dest. 100, A Brunnenwasser 100, Dextrose 5, NH_4NO_3 0,5, KH_2PO_4 0,25, $MgSO_4$ 0,125, *Mohrsches* Salz Spur, $ZnSO_4$ 0,0001.

20 ccm in 100-ccm-Kolben. 30° C.

	Frischgewicht g	Farbe der Nährlösung
S . . .	4,4	schwach gelb
A . . .	5,4	rotbraun

A war neutral, S sauer.
A + HCl: gelb, zum größten Teil ätherlöslich.
S + HCl: gelb, nicht ätherlöslich.

46. Versuch. 23. April bis 1. Mai 1925. Nährlösungen:

1. *Stark sauer*: H_2O 100. Dextrose 5, NH_4NO_3 0,5, Asparagin 1, KH_2PO_4 0,25, $MgSO_4$ 0,125, *Mohr*sches Salz Spur, $ZnSO_4$ 0,0001, H_2SO_4 so viel, daß Nährlösung ungefähr n/15 H_2SO_4.

2. *Schwach sauer*: dasselbe ohne H_2SO_4.

3. *Alkalisch*: statt NH_4NO_3 KNO_3, statt KH_2PO_4 K_2HPO_4, sonst wie 2.

Am 25. April war die Nährlösung von 1 farblos, 2 farblos, 3 gelb.

Am 27. April war die Nährlösung von 1 hellgelb, 2 dunkelgelb, 3 rotbraun.

Am 29. April war die Nährlösung von 1 gelb, 2 braun, 3 rot.

1 und 2: Humine. 3: Größtenteils Farbstoff.

Farbstoff und Humine stehen in enger Beziehung zueinander, denn die Humine entstehen offenbar aus dem Farbstoff (wenigstens zum Teil). Dieser bleibt vor Humifizierung nur dann verwahrt, wenn er in der Nährlösung nicht mit *großen* Eisenmengen (0,001 bis 0,01 Proz. Fe) zusammentrifft, oder gar mit Kupfer. Wird nur wenig Farbstoff gebildet (bei wenig Zink und Stickstoff oder in saurer Lösung) und erfolgt seine Bildung in stark eisenhaltiger Lösung, so findet man am Ende der Kultur keinen ätherlöslichen Farbstoff mehr vor, sondern nur mehr gelbes, alkohollösliches, nicht fällbares Humin.

47. Versuch. 20. bis 26. Februar 1926. Aus einer größeren Versuchsreihe mit der Nährlösung: H_2O 100, Saccharose 5, KNO_3 0,5, K_2HPO_4 0,25, $MgSO_4$ 0,125 (mit einer Spur Ammoniumsulfid und 1 Proz. Kohle gereinigt) wurden nach der Ernte die Kölbchen

mit 0,1, 1, 10 mg Fe pro 100 ccm,
und 2, 2, 2 „ Zn „ 100 „

zur Untersuchung der Lösung ausgewählt. 10 ccm Lösung wurden mit 1 Tropfen konzentrierter HCl versetzt und mit 20 ccm Äther extrahiert. Der Farbstoff wurde aus der Ätherlösung wieder in 5 ccm H_2O + 4 Tropfen KOH-Lösung überführt: rotviolett. Die nach der Ätherextraktion restierende Lösung: gelb (Humin).

Mg Fe pro 100 ccm . . .	0,1	1	10
mg Zn „ 100 „ . . .	2	2	2
Farbstoff	++	+	—
Humin	+	+++	+++

+++ = sehr stark, ++ = stark, + = schwach.

Kommt aber der Farbstoff in der Lösung mit Kupfer zusammen, dann geht die Humifizierung weiter bis zu dunkelbraunen Humusstoffen. Ob diese sich ohne weiteres in der Nährlösung fällen lassen, habe ich noch nicht versucht.

Daß der Farbstoff durch Kupfer und Eisen tatsächlich katalytisch oxydiert wird, geht daraus hervor, daß es mir gelang, den Farbstoff in alkalischer Lösung mit Spuren von Kupfer sowohl wie von Eisen in der Kälte zu zerstören. Dabei entstehen braune Humine. Mit Kupfer geht der Vorgang schneller als mit Eisen. Auch ohne besonderen Zusatz von Kupfer oder Eisen wird der Farbstoff in alkalischer Lösung langsam humifiziert. Das kann man verhindern, indem man der Lösung eine Spur Cyankali zufügt.

Jedenfalls sind die Bedingungen für die verschiedenartigen Färbungen der Nährlösung ganz ähnlich denen bei der Sporenfärbung, und es besteht die Beziehung:

0,4 mg Zn pro 100 ccm	10 mg Fe pro 100 ccm — Cu „ 100 „	Lösung gelb, Sporen gelb.
	10 mg Fe „ 100 „ 0,1 „ Cu „ 100 „	Lösung braun, Sporen schwarz.

Über den von Raulin entdeckten, in eisenarmen Lösungen entstehenden Stoff.

Raulin stellte fest, daß Aspergillus in „eisenfreien Lösungen“ einen Stoff gebildet hatte, der sich mit Ferrisalz rot färbte. Später zeigten dann *Javillier-Sauton*, daß dieser Körper nur bei Gegenwart von Zink entsteht, nicht bei gleichzeitigem Fehlen von Eisen und Zink. Durch Kulturen auf mit Kohle gereinigter schwach alkalischer Lösung gelang es mir, die Ansicht von *Javillier-Sauton* zu bestätigen. Ferner stellte ich fest, daß auch dann, wenn das Eisen wirklich fehlt, der fragliche Stoff offenbar nicht gebildet wird (Lebensnotwendigkeit des Eisens!). Für diese Bildung besteht eine

sehr niedrige optimale Eisenkonzentration. Zink ist zur Bildung unbedingt notwendig, fördert diese aber in jeder Konzentration. Je mehr Zink, um so mehr entsteht auch von der fraglichen Substanz.

48. Versuch. Genaue Beschreibung bei Versuch 36. Der fragliche Stoff war in beiden Eisenreihen ohne Zink nicht und am meisten in den Kolben mit höchster Zinkgabe gebildet. Die Kulturen mit 0,000001 Proz. Fe hatten mehr als doppelt so viel gebildet wie die ohne Fe (an der Intensität der Färbung gemessen).

Da das Zink anscheinend katalytische Funktionen im Eiweißstoffwechsel versieht, muß angenommen werden, daß auch dieser mit Eisen sich rot färbende Stoff ein Eiweißspaltprodukt ist. Das geht auch daraus hervor, daß seine Bildung erst ziemlich spät einsetzt.

Ließ ich auf die erste eisenfreie Kultur eine zweite mit Eisen folgen, dann wuchs der Pilz hierauf sehr gut, sofern er noch genügend Zucker hatte. Der Stoff ist also kein Gift und kein Rhodanid, wie *Raulin* vermutet hatte. Rhodanid auch deshalb nicht, weil die Färbung nicht rot, sondern mehr braunrot ist, und weil chemische Eigenschaften des Rhodans für diesen Stoff nicht zutreffen. Der Körper ist aber auch kein Zwischenprodukt des normalen Stoffwechsels. Denn sonst würde er doch wohl vom Pilz der zweiten Kultur verzehrt werden. Auch Hefe vermag ihn nicht zu zerstören. Nur eine unbekannte Art von Stäbchenbakterien, die mir einmal in eine solche Lösung zufällig hineingeraten waren, zerstörten den Stoff sehr schnell bei gleichzeitiger Reduktion des Nitrats (von NH_4NO_3) zum Nitrit.

So widerstandsfähig dieser Körper sich gegen biologische Angriffe erweist, um so labiler verhält er sich gegen chemische Agenzien. Seine Löslichkeit in H_2O ist sehr groß, weniger löslich ist er in Eisessig und noch etwas weniger in 96proz. Alkohol. Seine Kristallisation oder anderweitige Isolierung ist mir nicht gelungen.

Als ich eine mit wenig Eisen rotbraun gefärbte Lösung mit etwas Alkali versetzte, schwach erwärmte und dann wieder mit Salzsäure ansäuerte, war die Lösung nicht mehr rotbraun, sondern schön violett gefärbt. Aus verschiedenen Gründen nehme ich an, daß dieser neue Stoff durch die Alkaliwirkung aus dem rotbraun gefärbten entstanden ist (z. B. entsprach die Menge des einen stets der des anderen). Beweisen konnte ich das jedoch nicht, weil ich beide nicht isoliert habe.

Wenn die Umwandlung bei zu starker Alkalität vorgenommen wird, geht die Reaktion weiter, und die Lösung färbt sich dann mit Eisen nicht mehr. In den Nährlösungen, die Ammonnitrat oder Harnstoff enthielten, konnte ich Natronlauge verwenden, weil dann durch die Lauge Ammoniak frei gemacht wird und nur dies zur Einwirkung kommt. Enthielt die Lösung aber Natriumnitrat, dann ging die Wirkung der Lauge gleich bis zur völligen Zerstörung. In solchem Falle mußte ich die Reaktion mit Ammoniak vornehmen.

Setzte ich zur rotbraunen Lösung etwas Mineralsäure, so wurde die Farbe nur ganz wenig violettstichig. Dagegen wurde die Farbe nach Behandlung mit schwacher Lauge rein und tief violett, wenn dabei richtige Eisenmenge, richtige Temperatur und Zeit der Laugeneinwirkung und genügende Salzsäuremenge zur Anwendung kamen.

Bei jedem Versuch wurde eine besondere Kulturlösung und eine dieser angepaßte, besondere Eisenchloridlösung verwendet.



49. Versuch. 1. 2 ccm Lösung + 0,01 ccm $FeCl_3$ + 0,2 ccm n NaOH. Nach 2 Minuten + 0,4 ccm n HCl: *braunviolett.*

2. Dasselbe, aber 1 Minute bei 50°: *rein violett,* aber etwas schwächer als 1.

3. Dasselbe 2 Minuten bei 30°: *rein violett* ebenso stark wie 1.

Kochte ich 3, so trat allmählich völlige Entfärbung ein. Das blieb auch nach Abkühlen so. Nach erneutem Zusatz von $FeCl_3$ ließ ich die Lösung dann nur ganz schwach zu bräunlichrot wieder auffärben. Auch in der Kälte nahm die violette Farbe an Intensität ab. Nach einigen Stunden + $FeCl_3$: wieder volle Intensität.

50. Versuch. (5 ccm Lösung + 0,5 ccm n NaOH.) 2 Minuten bei 40°. Davon je 1 ccm

a) —
b) + 0,1 ccm $FeCl_3$
c) + 0,3 „ n HCl,
d) + 0,1 „ $FeCl_3$ + 0,3 ccm n HCl.

Nach 24 Stunden wurde bei a), b) und c) das ergänzt, was ihnen im Gegensatz zu d) noch fehlte. Dann waren gefärbt:

a) *violett,*
b) *violett,*
c) ganz schwacher *rötlichbrauner* Schimmer,
d) *sehr schwach violett.*

d) färbte sich mit $FeCl_3$ wieder etwas auf. Also war nur c) fast vollkommen zerstört. Dasselbe Resultat erhielt ich noch einmal bei denselben Bedingungen mit 0,4 ccm n HCl.

Also ist der Stoff in alkalischen Lösungen haltbar, in sauren nicht. Eisenchlorid hemmt den zerstörenden Einfluß der Salzsäure.

51. Versuch. 1. (0,5 ccm Lösung + 1 ccm $FeCl_3$ + 0,2 ccm n NaOH) 2 Minuten bei 50°. Nach Abkühlen + 2 ccm n HCl: *braunrot.* Bei 20°: *Dasselbe.*

2. (0,5 ccm Lösung + 1 ccm $FeCl_3$ + 0,5 ccm n NaOH) einen Augenblick in leuchtender Flamme. Dann abgekühlt. + 1 ccm n HCl: erst rein *rotbraun.* Dann ganz schwach violetter Stich.

3. (0,5 ccm Lösung + 0,1 ccm $FeCl_3$ + 0,5 ccm n NaOH) in der hohlen Hand erwärmt. Nach Abkühlung + 1 ccm n HCl: *rein tief violett.*

Dasselbe 2 Minuten bei 51°: *tief violett.*
„ 3 „ „ 51°: *etwas brauner.*
„ ¼ Stunde „ 100°: nur noch *schwach rötlich braun.*
„ ½ „ „ 100°: + 1 ccm n NaOH + 2 ccm n HCl: nur noch *schwach bräunlich.*

Ein Überschuß von Eisenchlorid verhindert also das Auftreten der violetten Farbe. Ebenso zu hohe Temperatur.

52. Versuch. *1.* (2 ccm Lösung + 0,5 ccm n NaOH) 1 Minute bei 40°. + 0,3 ccm $FeCl_3$ + 0,5 ccm n HCl: *rotbraun.* + 0,5 ccm n HCl außerdem: *rotviolett.*

2. Dasselbe 5 Minuten bei 40°. + 0,5 ccm n HCl: *rotbraun.* + außerdem noch 1 ccm n HCl: *tief violett.* Auch bei 1 mit mehr HCl violett.

Also nur bei starkem Ansäuern tritt die violette Farbe auf.

Beide Stoffe, der mit Eisen rotbraun und der mit Eisen violett gefärbte, verhalten sich betreffs Löslichkeit gleich. Beide reduzieren *Fehling*sche Lösung nicht. Beide werden jedoch von Kaliumpermanganat schon in der Kälte momentan oxydiert.

53. Versuch. Zwei Kulturen + und — Fe wurden mit $KMnO_4$ auf ihre Reduktionskraft geprüft: 5 ccm — Fe reduzierten bei Zimmertemperatur 28,2 ccm n/25 $KMnO_4$-Lösung, 5 ccm + Fe dagegen nur 3,0 ccm n/25 $KMnO_4$-Lösung. Die Lösung — Fe enthielt ziemlich viel von dem mit Ferrisalz sich rotbraun färbenden Stoff. Nach der Oxydation färbte Eisen nicht mehr.

54. Versuch. 5 ccm Lösung + zwei Kriställchen $KMnO_4$ bis zur bleibenden Braunsteinbildung. Aufgekocht und filtriert. Filtrat färbte sich mit Fe nicht mehr rotbraun. + 0,2 ccm konzentriertes NH_3. 1 Minute bei 30°. + HCl: keine violette Färbung.

Beide Stoffe wurden also durch Kaliumpermanganat zerstört.

Beide Stoffe reduzieren in der Kälte auch langsam Eisenchlorid. In der Hitze verläuft diese Reaktion sehr schnell. Mit Ferricyankali kann man die Reduktion des dreiwertigen Eisens zum zweiwertigen verfolgen.

55. Versuch. Eine Lösung mit dem fraglichen Stoff wurde auf vier Röhrchen verteilt. Zwei davon bekamen einen Überschuß von $FeCl_3$. Diese waren nun dunkelrot. Jetzt wurden alle vier dreimal 20 Minuten lang auf 100° erhitzt. Danach waren die Lösungen + Fe nur mehr bräunlichrot gefärbt. Beim Abkühlen dunkelten sie nur wenig nach. Auf erneuten Zusatz von $FeCl_3$ waren wieder alle kräftig gefärbt, etwas dunkler jedoch die ursprünglich ohne Eisen erhitzten.

Also hatte das Eisenchlorid etwas von dem Stoff oxydiert.

Nach Zusatz von etwas Eisen werden beide Stoffe auch beim gelinden Erwärmen mit Wasserstoffperoxyd momentan zerstört.

Die Ursache der Umfärbung ist die Lauge, nicht auch das Eisen. Wahrscheinlich ist dieser Vorgang eine Verseifung.

56. Versuch. a) (2 ccm Lösung + 0,5 ccm n NaOH + 0,1 ccm $FeCl_3$) 2 Minuten bei 40°.

b) (2 ccm Lösung + 0,5 ccm n HCl + 0,1 ccm $FeCl_3$) 2 Minuten bei 40°.

Darauf a) und b) mit 1,5 ccm n HCl:

a) *violett,*
b) *rotbraun.*

Dasselbe Resultat, wenn b) ohne NaOH und ohne HCl erwärmt wurde.

Dasselbe Ergebnis und noch einiges mehr brachte der nächste Versuch.



57. Versuch. 1. (2 ccm Lösung + 0,3 ccm FeCl + 0,75 ccm n NaOH) 2 Minuten bei 30°. Gekühlt. + 1,5 ccm n HCl: *violett.*

2. (2 ccm Lösung + 0,75 ccm n NaOH) 2 Minuten bei 30°. Gekühlt. + 1,5 ccm n HCl + 0,3 ccm $FeCl_3$: ebenso *violett.*

Also ist die Umfärbung allein der Lauge zu verdanken, nicht dem Eisen.

3. Dasselbe wie 1 mit ganz wenig $FeCl_3$: die violette Farbe trat erst schwach auf, verstärkte sich allmählich und wurde schließlich fast so stark wie mit der optimalen Eisenmenge.

Also bildet sich die violette Farbe mit einer Geschwindigkeit, die der Eisenkonzentration entspricht. Mit wenig Eisen verläuft diese Reaktion meßbar langsam.

4. Wie 1. behandelt: In zwei Teilen: a) gleich angesäuert: *violett*; b) erst 12 Stunden später angesäuert: Jetzt war b) stärker gefärbt als a) (siehe Versuch 50).

5. Nach Vorschrift 1. behandelt; aber statt n NaOH reichlich NH_3: ebenfalls *violett.*

Der Stoff aus der Aspergillusnährlösung wurde mit einigen bekannten Phenolen und Enolen verglichen.

58. Versuch. Brenzcatechin und Acetessigester gaben mit Eisenchlorid fast die gleiche Färbung. Acetessigester verträgt Erwärmen mit n NaOH nicht. Wohl aber, wenn man vorher Ammonacetat hinzugesetzt hat.

In meinen Lösungen kam ja auch Ammoniak und nicht Natronlauge zur Wirkung. In Lösungen, die kein Ammoniumsalz enthielten, konnte ich die Umwandlung auch nur mit Ammoniak und nicht mit Natronlauge vornehmen.

59. Versuch. Aspirinlösung nach Zusatz von Ammoniumacetat nach Vorschrift 1 von Versuch 59 behandelt:

1. ohne NaOH: *farblos,*
2. mit NaOH: *violett.*

Die aufgeführten Versuche machen es wahrscheinlich, daß es sich bei dem mit Eisen violett gefärbten Stoff um ein Phenol oder Enol handelt, das vielleicht durch Verseifung aus dem vom Pilze gebildeten, mit Ferrisalz sich rotbraun färbenden Stoff entsteht. Daß dieser gegen Sauerstoff so labile Körper gerade in eisenarmen Lösungen gebildet wird, steht mit der Rolle des Eisens als Oxydationskatalysator in vollem Einklang.

Niemals sah ich in den Nährlösungen Kristalle auftreten. Deshalb können beide Körper nicht mit dem von *Wijkman* beschriebenen Pilzprodukt $C_6H_6O_4$ identisch sein.

Auch das kürzlich von *Butkewitsch* beschriebene Enol in Kulturlösungen von Aspergillus oryzae, das sich mit Eisenchlorid violett färbt und *Fehling*sche Lösung reduziert, dürfte nicht dasselbe sein wie der hier beschriebene violette Stoff. Dieser reduziert *Fehling*sche Lösung nicht und kann auch nicht mit dem Zuckerabbau in Beziehung gesetzt werden.

Am Schluß dieses Kapitels möchte ich noch kurz eine Beobachtung erwähnen, die ich stets an „eisenfreien“ ammonnitrathaltigen Nährlösungen

machte, auf denen Aspergillus längere Zeit gewachsen war: solche Lösungen verbreiteten beim Kochen mit Calciumcarbonat oder Natronlauge einen intensiven Geruch nach Mäusen oder Acetamid. Mit gewöhnlichen, eisenhaltigen Lösungen habe ich diese Beobachtung nicht gemacht. Ob tatsächlich Acetamid oder etwas anderes (Aldehydammoniak) vom Pilz gebildet war, konnte ich nicht einwandfrei nachweisen.

IV. Die Wirkung von Eisen und Zink auf Hefe und Bacillus prodigiosus.

Die beschriebenen Versuche über Eisen und Zink gewinnen noch mehr an Bedeutung, wenn ich im folgenden zeige, daß diese Metalle nicht nur für Aspergillus lebensnotwendig sind, sondern auch im Stoffwechsel anderer Mikroorganismen eine hervorragende Rolle spielen. Hefe sowohl wie vor allem Bacillus prodigiosus reagieren sehr deutlich auf eine Verminderung der natürlichen Eisen- und Zinkkonzentrationen in den Nährlösungen. Dagegen konnte ich eine Kupferbedürftigkeit weder bei Bac. prodigiosus noch bei Hefe feststellen. Die physiologische Bedeutung dieses Metalls scheint also im Bereich der Mikroorganismen weniger allgemein zu sein. Dies liegt vielleicht in der Art der spezifischen Eigenschaft des Kupfers begründet, einige ganz bestimmte Oxydationsreaktionen zu katalysieren — bei Aspergillus die Bildung von Huminen —, oder die Methodik zur Entfernung des Kupfers aus der Nährlösung ist noch zu unvollkommen.

Das Arbeiten mit Hefe und Bac. prodigiosus gestaltete sich natürlich sehr viel schwieriger als mit Aspergillus, denn Hefe und Bakterien mit ihrer geringen Leibessubstanz brauchen sehr viel weniger Eisen und Zink, durchsetzen aber die ganze Nährlösung und kommen mit einer großen Oberfläche des Kulturgefäßes in Berührung. Deshalb werden sie auch in noch so sorgfältig gereinigten Lösungen immer noch eine genügende Menge Eisen und Zink vorfinden, um eine anscheinend beträchtliche Anzahl von neuen Zellen zu bilden. Ein Vergleich der Kulturen mit und ohne Eisen und Zink zeigte mir aber trotzdem einen großen Unterschied.

Meine Versuche mit Hefe und Bac. prodigiosus sind noch nicht in jeder Beziehung vollkommen. Es fehlen vor allem noch solche mit genauen Zählungen oder sonstigen Messungen der Zellvermehrung. Deshalb sind die hier aufgeführten Versuche nur als Ergänzungen zu den Hauptversuchen mit Aspergillus zu betrachten.

Hefe und Eisen.

Hefe nimmt im Hinblick auf den Stoffwechsel eine Sonderstellung ein. Während Aspergillus niger und Bac. prodigiosus ihren Energiebedarf vornehmlich durch typische Oxydationsreaktionen decken, gärt die Hefe und gewinnt somit ihre Lebensenergie hauptsächlich durch Spaltungsreaktionen. Trotzdem wird sie auch Eisen nötig haben, nämlich für den Teil ihrer Atmungsreaktionen, der nach *Meyerhof* typisch oxydativ verläuft, und der die Resynthese eines Teiles des vergorenen Materials zur Folge hat. Es ist deshalb aber verständlich,



daß sich Hefe mit sehr viel weniger Eisen begnügen kann als etwa Aspergillus. Ja, es scheint sogar, als ob eine Konzentration von 0,01 Proz. Fe bereits hemmend wirkte (siehe Versuch 61).

60. Versuch. 17. bis 24. Dezember 1925. Nährlösung: H_2O 300, Dextrose 30, Asparagin 1,5, K_2HPO_4 0,8, $MgSO_4$ 0,3, NaCl Spur.

Diese schwach alkalische Nährlösung wurde mit 1 Proz. Kohle gereinigt, in einen 300-ccm-Erlenmeyer filtriert und mit Aspergillus niger beimpft, der die zur Gärung notwendigen organischen N-haltigen Substanzen bilden sollte. Mit derselben gereinigten Lösung wurde auch eine 10-ccm-Pipette ausgespült. Nach 3 Tagen hatte sich Aspergillus schwach entwickelt. Nun wurde die Flüssigkeit aufgekocht und zu je 10 ccm in gleiche, gereinigte Röhrchen filtriert. Nach Sterilisation wurde beimpft mit je 3 Tropfen einer eisenfreien Aufschwemmung von Hefe „Winningen" (obergärig).

Von den 20 Röhrchen:

a) fünfmal je	+ 0,005 Proz.	Fe	+ 0,0001 Proz.	$ZnSO_4$,
b) „ „	+ 0,005 „	Fe	—	
c) „ „	—		+ 0,0001 Proz.	$ZnSO_4$,
d) „ „	—		—	

25° C. 17. Dezember 1925.

Am 21. Dezember bei allen schwache Gärung.

Am 23. Dezember Zunahme der CO_2-Entwicklung bei a) und b).

Am 24. Dezember hatte sich bei a) und b) am Meniskusrand ein dicker Hefering gebildet. c) und d) zeigten hier nur einen dünnen Hefeansatz.

Nur das Wachstum der Hefe ist von der Eisenkonzentration abhängig, die Gärung dagegen nicht (*Euler* und *Meyerhof*).

Neuberg und *Perlmann* haben gezeigt, daß die Gärung der Hefe durch Blausäure usw. zwar verzögert, aber nicht wie die Atmung sistiert werden kann, woraus sich die Entbehrlichkeit von Eisen und Kupfer für die Gärungsreaktion ergibt.

Hefe und Zink.

Wenn Zink tatsächlich eine allgemein wichtige Aufgabe im Stoffwechsel hat, dann muß es auch für Hefe lebensnotwendig sein. Aus dem Versuch 61 geht hervor, daß Zink das Wachstum der Hefe stark fördert und wahrscheinlich für diesen Vorgang auch bei Hefe unentbehrlich ist.

61. Versuch. 16. bis 23. März 1926. Dieselbe Nährlösung wie bei Versuch 60 mit einer Spur Ammoniumsulfid und 5 Proz. Kohle gereinigt. Je 25 ccm in 100-ccm-Kolben. Einmal sterilisiert. Beimpft mit Aspergillus niger. 12. bis 15. März bei 25 bis 30° C. Dann wurden die Mycelschleier mit Platinnadel herausgenommen und die Lösungen zweimal sterilisiert.

Nun fügte ich zu je vier Kölbchen:

a) — —
b) 0,01 Proz. Fe —
c) — 0,0004 Proz. Zn,
d) 0,01 Proz. Fe 0,0004 „ Zn,
e) wie d) + 0,0001 Proz. Cu.

Beimpft wurde am 16. März 1926 mit je einem Tropfen einer dünnen Aufschwemmung von Hefe „Winningen" in gereinigter, zweimal sterilisierter Nährlösung. Jeder Kolben bekam so nicht mehr als 100 Zellen. 25 bis 30° C.

Am 21. März gärten nur drei von c).

Am 22. März gärten alle.

Lösung	Anzahl Zellen in 1 cmm (Mittel von vier Kulturen und je zwei Zählungen)	Verbrauchter Zucker Proz.
a	14 500	4,2
b	60 500	5.2
c	81 500	7,3
d	64 000	5,3
e	56 000	5,2

Daß die Anzahl Zellen bei d) geringer ist als bei c), wäre unerklärlich, wenn man nicht annimmt, daß eine Eisenkonzentration von 0,01 Proz. für Hefe schon zu groß ist. Eine kräftige Förderung des Wachstums durch Zink ist unverkennbar [*Javillier* (2)]. Dagegen könnte man bei Kupfer eher auf eine Hemmung schließen.

Bacillus prodigiosus und Eisen.

Eine starke Hemmung des Wachstums durch Adsorption des Eisens aus den alkalischen Nährlösungen konnte ich ferner beobachten bei Oidium lactis, bei einem gelb gefärbten Kokkus und bei Bac. prodigiosus. Das Verhältnis der Trockengewichte von den geernteten Kulturen mit und ohne Eisen war bei Oidium lactis

$$+ \text{Fe} : - \text{Fe} = 15 : 8.$$

Bei diesem Versuch habe ich noch saure Nährlösungen mit KH_2PO_4 verwendet. Die gelb gefärbten Kolonien des nicht näher bekannten Kokkus wurden in von Eisen gereinigten Lösungen erst sehr viel später wahrgenommen, als in solchen, denen nachträglich wieder eine optimale Eisenmenge zugesetzt war.

62. Versuch. 21. bis 25. Mai 1925. Nährlösung: H_2O 100, Asparagin 1, Glucose 0,5, KH_2PO_4 0,2, Na_2CO_3 0,25, $MgSO_4$ 0,04. Mit Kohle gereinigt.

Je zweimal 50 ccm in 250-ccm-Kolben. — Fe und + Fe.



Nach Sterilisation beimpft am 21. Mai 1925. Zimmertemperatur. Am 25. Mai: Auf den Oberflächen der Nährlösungen mit Eisen schwammen dicht an dicht gelbe Kolonien, während bei denen ohne Eisen makroskopisch weder Färbung noch Wachstum wahrzunehmen waren. Dasselbe wurde bei einem zweiten Versuch beobachtet.

Eingehender habe ich mich jedoch nur mit Bac. prodigiosus befaßt, weil bei ihm die Wirkung des Eisens sehr augenscheinlich war. Das, was gleich bei dem ersten Versuch auffiel, war nämlich die Tatsache, daß prodigiosus ohne Eisen keinen roten Farbstoff bildet.

63. Versuch. 14. bis 20. Mai 1925. Nährlösung: H_2O 100, Asparagin 1, Glucose 0,5, KH_2PO_4 0,2, Na_2CO_3 0,25, $MgSO_4$ 0,04.

I. + Fe, II. − Fe.

Auf diese Lösung wurde, nachdem sie mit Kohle gereinigt war und die eine Hälfte davon wieder etwas Eisen bekommen hatte (Spur *Mohr*sches Salz), Bac. prodigiosus von einer roten Kartoffelkultur geimpft. 14. Mai 1925.

Bei Zimmertemperatur kultiviert, färbte sich I schon am 16. Mai schwach rot. Am nächsten Tage war I rot, II völlig farblos. So war es auch noch am 20. Mai. II blieb farblos. Aber die Kulturen mit und ohne Eisen unterschieden sich außer in der Färbung auch noch in manch anderer Hinsicht: Die Bakteriensuspension von I war viel dichter als von II. I war stark alkalisch, II nur ganz schwach. Auf dem Boden von I lagen viel $MgNH_4PO_4$-Kristalle, die bei II fehlten. I verbreitete einen starken Geruch nach Acetamid und Ptomainen, während II angenehm süßlich nach Milch roch. Also alles Unterschiede, die die Hemmung durch Eisenmangel deutlich zeigen.

Dieselben und weitere Beobachtungen machte ich beim 64. und 65. Versuch, die einen Vergleich zwischen der Wirkung des Eisens und der des Magnesiums darstellten.

64. Versuch. 25. Juni bis 2. Juli 1925. Temperatur und Nährlösung wie beim vorigen Versuch ohne $MgSO_4$. In 250-ccm-Kolben je einmal

50 ccm + Fe + $MgSO_4$,
50 „ + Fe −
50 „ − + $MgSO_4$,
50 „ − −

Am 28. Juni:

+ Fe + Mg: *rot,*
+ Fe − Mg: am Meniskusrand noch eben wahrnehmbarer rötlicher Schimmer,
− Fe + Mg: völlig farblos,
− Fe − Mg: „ „

Am 2. Juli: nur + Fe + Mg hatte reichliche Mengen $MgNH_4PO_4$-Kristalle abgeschieden. Die Bakterien flockten aus und die Lösung verfärbte sich hellbraun. Im übrigen dasselbe.

65. Versuch. 20. August bis 3. September 1925. Dieselben Kulturbedingungen wie im 66. Versuch. Die Lösungen ohne $MgSO_4$ erhielten 0,04 Proz. K_2SO_4.

Je zweimal 100 ccm in ½-Liter-Kolben.

1. + Fe + Mg,
2. + Fe − Mg,
3. − Fe + Mg,
4. − Fe − Mg.

Am 23. August: 1. *Rot.* Lösung gleichmäßig getrübt und gefärbt.

1. Ein Kolben gleichmäßig ganz *schwach rosa*, der andere nur am Meniskusrand mit schwach rötlichem Schimmer. Lösung gleichmäßig getrübt.

3. und 4. *völlig farblos.* Flüssigkeiten über dem Bodensatz klar.

Am 24. August: 1. Beide sehr stark rot gefärbt und gleichmäßig getrübt.

2. Die Farbe ist von schwach Rosa in ein helles Braun übergegangen. Sonst dasselbe.

Am 3. September reagierten alle auf Lackmus alkalisch.

1 und 2 rochen nach Ptomainen, 1 jedoch reiner und stärker als 2.

3 und 4 rochen süßlich nach Milch, 3 jedoch stärker und reiner als 4.

Die mikroskopische Untersuchung (mit Carbolfuchsin gefärbte Präparate) ergab, daß die Bakterien von 1 bereits stark autolysiert und ihre Umrisse nicht mehr zu erkennen waren. 2 enthielt ein Gemisch von Kurzstäbchen und langen Fäden. In 3 und 4 fand ich nur Kurzstäbchen.

Diese eigenartige Fadenform habe ich später noch einmal beobachtet. Und zwar enthielt eine Nährlösung mit $MgSO_4$ und mit 0 Fe Kurzstäbchen, 0,0001 Proz. Fe Kurzstäbchen, 0,001 Proz. Fe Langstäbchen, 0,01 Proz. Fe Langstäbchen mit vielen langen Fäden.

Fischer gibt an, daß wiederholte Zuchten auf schwach sauren Nährböden den Bac. prodigiosus zur Bildung von Langstäbchen und langen Fäden mit lebhafter Eigenbewegung veranlassen. Die typischen Kurzstäbchen sollen wieder auftreten, sobald der Nährboden alkalisch ist. Diese Beobachtung stimmt mit meiner insofern überein, als die Ursache dieses Formwechsels wahrscheinlich das Eisen ist. Denn in sauren Medien steht dem Bacillus mehr Eisen zur Verfügung als in alkalischen.

Aus Versuch 64 und noch mehr aus Versuch 65 schließe ich, daß Eisen auch für Bac. prodigiosus wahrscheinlich lebensnotwendig ist, denn es ist mindestens ebenso wichtig wie Magnesium. Die Versuche *Samkows* lehren, daß Magnesium zur Bildung des Prodigiosins unentbehrlich, jedoch in der Asche dieses Stoffes nicht enthalten ist. Das Magnesium hat eben eine vitale Hauptfunktion, deren Schwächung



bei Bac. prodigiosus die Bildung des Farbstoffs verhindert. Ich bin überzeugt, daß Bac. prodigiosus auf den Lösungen ohne Magnesium auch keine Spur Farbstoff gebildet hätte, wenn ich diese Nährlösungen ebenso gründlich von Magnesiumverunreinigungen befreit hätte wie von Eisenverunreinigungen.

Bacillus prodigiosus und Zink.

Im Gegensatz zum Eisen schien das Zink für Bac. prodigiosus belanglos zu sein. Denn bislang hatte ich den Nährlösungen niemals Zink zugesetzt. Ein Zusatz von Zinksulfat brachte auch keine wesentlich neuen Resultate.

66. Versuch. 1. bis 8. Juni 1925. Die übliche Nährlösung mit $MgSO_4$ und 0,0002 Proz. $ZnSO_4$ und mit Kohle gereinigt. Je einmal 50 ccm ohne Eisen und mit Eisen (Spur *Mohr*sches Salz) in 300-ccm-Kolben. Beimpft mit prodigiosus von Kartoffelkultur. Kultiviert bei etwa 20° C.

Am 4. Juni: + Fe: kräftig rot.
— Fe: farblos.

Am 5. Juni: + Fe: sehr stark rot.
— Fe: farblos.

Am 7. Juni: + Fe: Beginn der Ausflockung.
— Fe: farblos.

Am 8. Juni: + Fe: Beginn der Verfärbung.
— Fe: noch immer farblos.

Allerdings fiel mir das leuchtende Rot der + Fe-Kultur auf, das diesmal besonders stark hervortrat. Die Erklärung hierfür ergab sich aus den folgenden Versuchen.

Bei Zusammenstellung der Nährlösung hatte ich immer die gewöhnliche, unreine, wasserhaltige Soda verwendet. Später nahm ich dieselbe Gewichtsmenge von reiner kalzinierter Soda, ohne dabei zu bedenken, daß dadurch die Nährlösung nun ungefähr doppelt so viel Na_2CO_3 enthielt wie früher. Die Folge davon war, daß Bac. prodigiosus auf diesen Lösungen auch mit Eisen keinen Farbstoff bildete.

Die Ursache dieser Schädigung war weniger eine durch die Alkalität bedingte Fällung des Eisens, als vielmehr eine vollkommene Fällung und Adsorption der natürlichen Zinkverunreinigungen. Während die gewöhnliche Menge Soda gerade ausreichte, um das saure Phosphat zu neutralisieren, also die Lösung nicht alkalisch machte und darum auch das Zink nicht fällen konnte, blieb jetzt bei der doppelten Menge ein Überschuß von Soda in der Lösung, diese wurde alkalisch, und Zink wurde als Zinkcarbonat gefällt und adsorbiert.

Wenn Zink für Bac. prodigiosus überhaupt Bedeutung hatte, dann mußte sich jetzt, wo es durch die Adsorption beseitigt und nicht wieder

ersetzt war, eine Schädigung bemerkbar machen. Die schon erwähnten und noch folgenden Experimente bestätigten meine Vermutungen. War die Konzentration der Soda nicht gar zu groß, dann konnte ihr schädigender Einfluß durch nachträglichen Zinkzusatz aufgehoben werden.

67. *Versuch.* 19. bis 23. Dezember 1925. Die übliche Nährlösung mit den Sodamengen:

1 = 0,24 Proz. wasserhaltige Na_2CO_3,
2 = 0,48 „ „ Na_2CO_3,
3 = 0,12 „ trockene Na_2CO_3,
4 = 0,24 „ „ Na_2CO_3.

Diese Lösungen wurden mit 1 Proz. Kohle gereinigt. Je zweimal 25 ccm in 100-ccm-Kolben. + 0,004 Proz. Fe, ± 0,001 Proz. $ZnSO_4$. Zimmertemperatur.

Am 21. Dezember hatten deutlich rote Oberfläche: 1, 1 + Zn, 3 + Zn. Schwächer gefärbt waren: 2 + Zn und 3. Noch schwächer: 4 + Zn. Noch gar nicht gefärbt waren: 2 und 4[1]).

Am 23. Dezember ließen sich die Kulturen nach ihrer Farbstärke in folgender Reihe anordnen:

1 + Zn > 3 + Zn > 2 + Zn > 1 > 3 > 4 + Zn > 2 > 4 (farblos).

68. *Versuch.* 15. bis 19. März 1926. Die übliche Nährlösung. Ein Teil mit 0,12 Proz. Na_2CO_3 (Lösung 1), der andere mit 0,24 Proz. Na_2CO_3 (Lösung 2). Es wurde wasserfreie Soda verwendet. Beide Lösungen wurden mit einer Spur Ammoniumsulfid und 5 Proz. Kohle gereinigt. Von Lösung 1 je zweimal 25 ccm in 100-ccm-Kolben.

Gereinigt {
+ 0,01 Proz. Fe — Zn,
+ 0,01 „ Fe + 0,0004 Proz. Zn,
+ 0,01 „ Fe + 0,004 „ Zn,
+ 0,00001 „ Fe + 0,004 „ Zn.

Außerdem von ungereinigter Lösung 1 zweimal + 0,01 Proz. Fe ± 0,0004 Proz. Zn.

Von Lösung 2 ebenfalls je zweimal 25 ccm in 100-ccm-Kolben mit folgenden Eisen-, Zink- und Kupfermengen.

mg Fe pro 100 ccm	mg Zn pro 100 ccm			mg Cu pro 100 ccm
0	0	0,4	4	—
0,01	0	0,4	4	—
10	0	0,4	4	—
10		0,4		0,1

Außerdem auch hier zweimal von der nicht gereinigten Lösung + 0,01 Proz. Fe ± 0,0004 Proz. Zn. Sämtliche Kolben wurden mit

[1]) Zahlen allein bedeuten: Ohne Zn!

einer sehr dünnen Bakterienaufschwemmung in gereinigter Lösung steril mit Pipette beimpft und bei 15 bis 20° aufgestellt.

Am 19. März: Gereinigte Lösung 2: sämtlich farblos. Nicht gereinigte Lösung 2 — Zn: bräunlich. Nicht gereinigte Lösung 2 + Zn: schwach rötlichbraun. Die gereinigten Lösungen 1 bildeten eine nach Zinkkonzentration und Farbintensität schön ansteigende Reihe.

0,01 Proz. Fe { — Zn: fast farblos,
+ 0,0004 Proz. Zn: schwach rot,
+ 0,004 Proz. Zn: stark rot.

Das Rot war jedoch auch hier nicht ganz rein. Es hatte einen schwach bräunlichen Stich. Dagegen war das Rot der Lösung mit

0,00001 Proz. Fe + 0,004 Proz. Zn

sehr kräftig und leuchtend mit schwach violettem Stich. Es ist sehr bezeichnend, daß das reinste Prodigiosin am stärksten gebildet wird bei relativ niedriger Eisenkonzentration und hoher Zinkkonzentration. Die beiden Kolben mit Kupfer waren nicht gefärbt und zeigten auch sonst nichts Besonderes.

Der nachträgliche Zusatz von Zink zur gereinigten Lösung 2 hat nichts genutzt, weil diese Lösung viel Soda enthielt, die das zugefügte Zink restlos wieder ausfällte.

Aus den beiden letzten Versuchen ist zu entnehmen, daß zur Bildung des Prodigiosins auch Zink unentbehrlich und darum für Bac. prodigiosus wahrscheinlich auch lebensnotwendig ist.

An dieser Stelle möchte ich noch einmal darauf hinweisen, daß manche Rätsel, denen andere Forscher (*Ruhland*, *Grohmann*) bei der Kultur von Mikroorganismen begegnet sind, sich vielleicht auf dieselbe oder ähnliche Weise erklären lassen. Sicher werden oft Eisen, Zink oder Kupfer oder noch andere Elemente eine Rolle dabei gespielt haben. Wenn z. B. *Ruhland* festgestellt hat, daß seine Knallgasbakterien in hitzesterilisierten Lösungen auch bei nachträglichem Zusatz von Eisen nicht immer wuchsen, so liegt die Möglichkeit vor, daß das von ihm nicht berücksichtigte Zink oder auch noch andere Elemente ebenfalls ausgefällt waren. (Auch die Ausfällung des Magnesiumammoniumphosphats wäre dabei in Betracht zu ziehen.) Ebenso müssen künftig bei Züchtungen von Farbvarianten diese großen Wirkungen kleinster Mengen katalytisch wirkender Elemente gebührend berücksichtigt werden, was bei früheren Untersuchungen sicher nicht geschehen ist.

Prodigiosin.

Ich habe gezeigt, daß zur Bildung des Prodigiosins nicht nur Magnesium, sondern auch Eisen und Zink notwendig sind. Ohne Eisen blieben die Kulturen völlig farblos. Fügte ich nun aber zu solchen Lösungen eine Spur Ferrosalz, so wurde momentan eine geringe Färbung



von der typischen Farbe des Prodigiosins sichtbar. Diese nachträgliche Färbung gelang am stärksten nicht in völlig eisenfreien Kulturen, sondern in solchen, die 0,00001 Proz. Fe enthielten. Dann war das Wachstum stärker, und von der Leucoverbindung konnte infolgedessen mehr gebildet werden. Natürlich war aus demselben Grunde die Färbung auch hier nur ganz minimal.

Ich spreche hier von einer Leucoverbindung, weil ich annehme, daß der rote Farbstoff Prodigiosin durch Oxydation eines ungefärbten Körpers, der Leucoverbindung, entsteht, was ja auch die allgemeine Annahme ist. Diese Oxydation vermittelt das Eisen in der Lösung, denn die Auffärbung gelingt nur mit Ferro-, nicht mit Ferrisalz, und außerdem geht die Reaktion in alkalischer Lösung vor sich.

Das Eisen hat also neben der lebensnotwendigen Hauptfunktion auch noch diese Funktion zweiten Grades, eine Leucoverbindung zum Prodigiosin zu oxydieren. Eine chemische Bindung des Eisens im Prodigiosinmolekül erscheint mir unwahrscheinlich. *Samkow* fand allerdings in der Asche des Farbstoffs Eisen. Es ist aber möglich, daß dies Verunreinigungen waren.

Die Nachfärbung mit Ferrosalz ist auch um so stärker, je mehr Zink dem Bacillus zur Verfügung stand. Ohne Zink wurde, wie auch ohne Magnesium, die Leucoverbindung nicht gebildet. Dementsprechend tritt das Prodigiosin auch am reinsten und stärksten auf in solchen Lösungen, die viel Zink und wenig Eisen enthalten. Hier ist es von leuchtend roter Farbe mit violettem Stich, während es in Kulturen mit mehr Eisen schmutzig braun aussieht. In Kulturen mit natürlicher Eisenkonzentration geht ja bekanntlich die Farbe allmählich von rot ebenfalls in braun über (*Eisler-Portheim*). Auch beim Nachfärben farbloser Kulturen mit Ferrosalz tritt die rote Prodigiosinfarbe nur mit ganz wenig Eisen auf. Mit mehr Eisen geht die Farbe sofort in schmutzigbraun über. Auch diese Eisenkonzentration ist noch so gering, daß die Braunfärbung nicht von Eisenhydroxyd herrühren kann. Vielleicht beruht diese Verfärbung und Denaturierung auf einer Überoxydation. Möglicherweise ist es eine Huminbildung analog derjenigen in Aspergillus-Nährlösungen.

V. Schlußbetrachtung.

Wenn man die Ergebnisse der vorliegenden Versuche zusammenfaßt und weiterhin in Rechnung zieht das, was über Eisen, Zink und Kupfer in der Tierphysiologie und Medizin (*Warburg-Minami*, *Cristol* und *White*) und in der Enzym- und Vitaminforschung bekannt ist, dann kommt man zu der Überzeugung, daß die Ergebnisse dieser Arbeit in der Organismenwelt weitgehend verallgemeinert werden können. Eisen und Zink sind lebensnotwendig. Kupfer ist zum mindesten für einige Organismen sehr wichtig.



Die Rolle des Eisens als Oxydationskatalysator wird heute allgemein anerkannt. Neben das Eisen tritt nun als zweiter Oxydationskatalysator von untergeordneter Bedeutung das Kupfer. Über die katalytische Tätigkeit des Zinks wissen wir jedoch noch nichts Genaues.

Die Enzymchemie muß aus der vorliegenden Arbeit die Lehre ziehen, daß bei Herstellung aschefreier Präparate von Oxydasen größte Vorsicht am Platze ist. Ob die in der Literatur erwähnten Präparate wirklich von den letzten wirksamen Spuren Eisen oder allgemein von Metallen frei waren, erscheint nunmehr sehr zweifelhaft (*Oppenheimer*). Die sogenannten Co-Enzyme sind vielleicht zum Teil solche Spuren bestimmter Aschenelemente.

Wenn sich die Befunde *Bertrands* (1) (2) bei seinen Zinkversuchen mit Mäusen bestätigen sollten, wäre auch die Vitaminforschung um ein gut Teil vorwärts gekommen.

Mit diesen drei Metallen ist die Reihe der anorganischen Biokatalysatoren sicher noch nicht abgeschlossen. Meine Untersuchungen auf diesem Gebiete hoffe ich in kürzester Zeit fortsetzen zu können.

Zusammenfassung.

Es wurde eine Methode beschrieben (Adsorption an Blutkohle), die eine schnelle und gründliche Beseitigung der natürlichen Eisen-, Zink- und Kupferverunreinigungen aus Kulturlösungen für Mikroorganismen ermöglicht. Mit Hilfe dieser Methode konnte ich folgendes feststellen:

1. Eisen und Zink sind für Aspergillus niger lebensnotwendig.

2. Kupfer ist zur Bildung des schwarzen Konidienfarbstoffs von Aspergillus niger unentbehrlich und erhöht zugleich auch die Trockensubstanzproduktion.

3. Außer Eisen, Zink und Kupfer haben noch andere, bislang noch nicht bestimmte Aschenelemente für Aspergillus niger Bedeutung.

4. Zink fördert das vegetative Wachstum und hemmt die Fruktifikation bei Aspergillus niger.

5. Der schwarze Sporenfarbstoff von Aspergillus niger ist ein Gemisch von verschiedenen Huminen.

6. Aspergillus niger bildet bei Gegenwart von viel Zink und viel Stickstoff auf schwach alkalischen Lösungen einen schönen Farbstoff (alkalisch violett und wasserlöslich, sauer gelb und ätherlöslich), der wahrscheinlich in Beziehung zur Huminbildung steht.

7. An der Huminbildung bei Aspergillus niger ist außer Kupfer auch Eisen beteiligt.

8. In eisenarmen Lösungen bildet Aspergillus niger den schon von *Raulin* entdeckten Stoff, der gegen Sauerstoff sehr labil ist. Beim Erwärmen mit Alkali entsteht ein mit Eisen sich schön violett färbender



Körper, der sich wie ein Phenol oder Enol verhält und wahrscheinlich aus dem *Raulin*schen Stoff hervorgeht.

9. Eisen und Zink sind wahrscheinlich auch für Bacillus prodigiosus lebensnotwendig. Zink ist wahrscheinlich auch für Hefe lebensnotwendig.

10. Kupfer hatte für Hefe und Bacillus prodigiosus bei meinen Versuchen keine Bedeutung.

11. Bacillus prodigiosus bildet ohne Eisen sowohl wie ohne Zink kein Prodigiosin.

12. Eisen ist auch an der Bildung des Prodigiosins unmittelbar beteiligt. Ohne Eisen bildet der Bacillus eine Leucoverbindung, aus der mit Ferrosalz der Farbstoff entsteht.

Zum Schluß möchte ich nochmals darauf hinweisen, daß man bei Mißerfolgen mit der Kultur von Mikroorganismen stets auf etwaige Fällungen von Eisen, Zink und Kupfer und vielleicht auch noch anderer Elemente bedacht sein muß einschließlich der Ausfällung von Ammoniummagnesiumphosphat in alkalischen Lösungen. Dies gilt nicht nur in Hinsicht auf den Trockensubstanzertrag, sondern auch, wie bei der Wirkung des Kupfers auf Aspergillus, in Hinsicht auf Veränderungen typischer innerer Merkmale.

Anhang.

Nach längerer Zeit wurde die Reproduzierbarkeit der Hauptversuche mit Aspergillus geprüft und bestätigt:

Versuch. 24. bis 30. Oktober 1926. Nährlösung: H_2O 100, Saccharose 10, $NaNO_3$ 1, K_2HPO_4 0,25.

a) Je 50 ccm in 250-ccm-Kolben mit 0,1 Proz. Na_2SO_4, 0,001 Proz. Fe, 0,0004 Proz. Zn, 0,00004 Proz. Cu und mit verschiedenen Magnesiummengen.

b) Nährlösung + 0,15 Proz. $MgSO_4$ mit einer Spur Ammoniumsulfid, und 5 Proz. Kohle gereinigt und dann mit verschiedenen Eisen-, Zink- und Kupfermengen, wobei die Eisenreihe 0,0004 Proz. Zn und 0,00004 Proz. Cu zugefügt bekam, die Zinkreihe 0,001 Proz. Fe und 0,00004 Proz. Cu und die Kupferreihe 0,001 Proz. Fe und 0,0004 Proz. Zn. (Alle Metalle wurden als Sulfate gegeben.)

Die Kolben wurden alle vorsichtig mit Aspergillus beimpft und bei 25 bis 30° C aufgestellt.

Aus den Tabellen und Kurven (3, 4) ist zu entnehmen, daß die Ergebnisse der Arbeit durchaus reproduzierbar sind. Ferner geht daraus hervor, daß der Wirkungsfaktor von Eisen sowohl wie auch von Zink und Kupfer sehr viel größer ist als der des Magnesiums. Die Kulturen haben an den beiden letzten Tagen reichlich warm gestanden. Deshalb ist der Schnittpunkt der Eisenkurve (nicht gezeichnet) mit der Ordinate etwas höher gerückt als sonst. Auch das Fallen der Kurven

mg Fe pro 100 ccm	Trockengewicht g	mg Zn auf 100 ccm	Trockengewicht g	mg Cu pro 100 ccm	Trockengewicht g	mg Mg pro 100 ccm	Trockengewicht g
0	0,27 0,23	0	0,06 0,07	0	0,90 0,84	0	0,01 0,015
0,001	0,35 0,33	0,001	0,13 0,18	0,0001	0,87 0,88	0,1	0,10 0,10
0,005	0,69 0,65	0,005	0,54 0,44	0,0005	0,94 0,90	1	0,80 0,84
0,01	0,85 0,90	0,01	0,87 0,86	0,001	0,96 0,95	10	1,75 1,73
0,02	1,34 1,28	0,02	1,30 1,34	0,002	1,05 0,95	20	1,83 1,75
0,04	1,39 1,36	0,04	1,41 1,51	0,01	1,26 1,02		
0,07	1,32 1,38	0,07	0,40 1,43	0,04	1,10 1,17		
0,1	1,31 1,36	0,1	1,30 1,27	0,05	1,20 1,13		
0,5	1,18 1,24	0,5	1,28 1,19	0,07	1,09 1,22		
1,0	1,18 1,26	1,0	1,29 1,28	0,1	1,28 1,32		

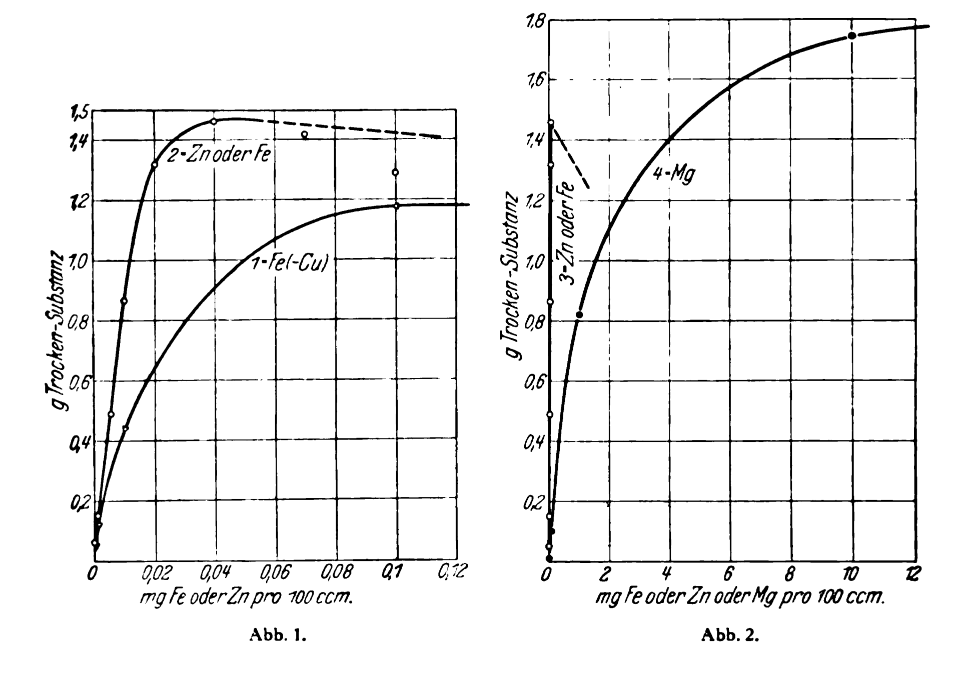


Abb. 1.

Abb. 2.

bei höheren Konzentrationen wird sicher dadurch beeinflußt. Die Abhängigkeit der Kurven von Temperatur und Zeit muß natürlich

noch untersucht werden. Der gesetzmäßige Verlauf der Eisen- und Zinkkurve steht im Gegensatz zu dem der Kupferkurve (diese nicht gezeichnet!). Aus dieser ist *nur* ein Ansteigen des Erntegewichts zu entnehmen. Die optimale Wirkung, auch betreffs Schwarzfärbung der Sporen, lag hier ungefähr bei 0,00001 Proz. Cu.

Literatur.

Abderhalden, Handb. d. biochem. Arbeitsmethod. **1**, Berlin 1910. — *Arcichowskij*, Autoreferat i. Zentralbl. f. Bakt. II, **21**, 430, 1907. — *Baudisch* und *Welo*, Die Naturwissensch. **13**, 749, 1925. — *Benecke*, Jahrb. f. wissensch. Bot. **28**, 487, 1895. — *Bertrand* (1), Bull. Soc. Chim. Biol. **6**, 203. — *Derselbe* (2), C. r. de l'Accad. d. sc. **175**, 289, 1913. — *Derselbe* (3), ebendaselbst **154**, 616, 1912. — *Derselbe* (4), ebendaselbst **154**, 381, 1912. — *Bertrand* und *Javillier* (1), ebendaselbst **152**, 225, 1911. — *Dieselben* (2), Ann. Inst. Pasteur **26**, 241, 1912. — *Birckner*, Journ. of biol. Chem. **38**, 191, 1919. — *Bondansky*, C. r. **173**, 790, 1921. — *Brenner*, Zentralbl. f. Bakt. II, **40**, 555, 1914. — *Buromsky*, ebendaselbst II, **36**, 54, 1913. — *Butkewitsch* (1), Jahrb. f. wissensch. Bot. **38**, 147, 1903. — *Derselbe* (2), Planta, Arch. f. wissensch. Bot. **1**, 657, 1926. — *Butkewitsch* und *Orlow*, diese Zeitschr. **132**, 556, 1922. — *Cristol*, C. r. **174**, 887, 1922. — *Cugini*, Justs bot. Jahresber. **4**, 114, 1876. — *Czapek*, Biochem. d. Pflanzen, 2. Aufl., **3**, 374. Jena, G. Fischer, 1920. — *Eisler* u. *Portheim*, Zentralbl. f. Bakt. II, **40**, 1, 1914. — *v. Euler* u. *Nilsson*, Chem. d. Zelle u. Gewebe **12**, 238, 1925. — *Fischer*, Vorles. üb. Bakterien. Jena 1903. — *Fodor*, Grundlagen der Dispersoidchemie. Dresden 1925. — *Fresenius* u. *Harpuder*, Klin. Wochenschr. **1926**, 2305. — *Gris*, C. r. **21**, 1386, 1845. — *Grohmann*, Zentralbl. f. Bakt. II, **61**, 256, 1924. — *Haenicke*, Zeitschr. f. Bot. VIII, 225, 1916. — *Hansen*, Flora **73**, 152, 1890. — *Höber*, Phys. Chem. d. Zelle u. d. Gewebe. Leipzig 1922. — *Yabusoe*, diese Zeitschr. **157**, 388, 1925. — *Javillier* (1), C. r. **155**, 190, 1912. — *Derselbe* (2), Thèse doct. Paris Sc. nat. 1908. — *Javillier* und *Sauton*, C. r. **153**, 1177, 1911. — *Iwanoff*, Zentralbl. f. Bakt. II, **13**, 140, 1904. — *Kosinski*, Jahrb. f. wiss. Bot. **37**, 137, 1901. — *Kostytschew*, Pflanzenatmung (Monographien aus d. Gesamtgeb. d. Physiologie d. Pflanzen u. d. Tiere 8. Berlin, J. Springer, 1924). — *Lappalainen*, Akadem. Abhandl. Helsingfors 1919. — *Lepierre*, Bull. Soc. Portug. Sc. nat. Lisbonne **6**, 10, 1912. — *Linossier* (1), C. r. **112**, 489, 1891. — *Derselbe* (2), C. r. **151**, 1075, 1910. — *Lucas*, Liebigs Ann. d. Chem. **37**, 90, 1841. — *Meyerhof*, diese Zeitschr. **162**, 43, 1925. — *Meyerhof* und *Finkle*, Chemie d. Zelle u. Gewebe **12**, 157, 1925. — *Milburn*, Zentralbl. f. Bakt. II, **13**, 268, 1904. — *Mayer*, Lehrb. d. Gärungschemie, S. 144. Heidelberg 1879. — *Molisch*, Die Pflanze in ihren Beziehungen zum Eisen. Jena 1892. — *Nägeli*, Neue Denkschr. d. allgem. Schweizer Ges. f. d. ges. Naturw. **33**, 1893. — *Neuberg* u. *Perlmann*, diese Zeitschr. **165**, 238, 1925. — *Nikitinsky*, Jahrb. d. wiss. Bot. **40**, 1, 1904. — *Ono*, Zentralbl. f. Bakt. II, **9**, 154, 1902. — *Oppenheimer*, Die Fermente u. ihre Wirkungen, 5. Aufl., Lief. 9, 1926. — *Orlowski*, Referat Zentralbl. f. Bakt. II, **12**, 136, 1902. — *Palladin*, Ber. d. d. bot. Ges. **5**, 325, 1887. — *Raulin*, Ann. d. sc. nat. **11**, 93, 1869. — *Richards*, Jahrb. f. wiss. Bot. **30**, 665, 1897. — *Richter*, Zentralbl. f. Bakt. II, **7**, 417, 1901. — *Ritter*, Ber. d. d. bot. Ges. **27**, 582, 1909. — *Rost*, Ber. d. pharm. Ges. **29**, 549, 1919. — *Ruhland*, Jahrb. f. wiss. Bot. **63**, 321, 1924. — *Sakamura*, Journ. of College of Agriculture Hokkaido Imperial University **14**, 65, 1924. — *Samkow*, Zentralbl.

f. Bakt. II **11**, 305, 1903. — *Sauton* (1), C. r. **151**, 241, 1910. — *Derselbe* (2), Ann. d. l'Inst. Pasteur **25**, 922, 1911. — *Schiemann*, Zeitschr. f. indukt. Abstammungs- u. Vererbungslehre 8, 1, 1912. — *Schimper*, Bot.-Ztg. **49**, 257, 1891. — *Schulz*, Justs bot. Jahresber. **5**, 84, 1877. — *Warburg* (1), diese Zeitschr. **119**, 134, 1921. — *Derselbe* (2), ebendaselbst **136**, 266, 1923. — *Derselbe* (3), Ber. d. d. chem. Ges. **58**, 1001, 1925. — *Warburg* und *Minami*, diese Zeitschr. **142**, 317, 1923. — *Wehmer*, (1) Bot.-Ztg. **49**, 249, 1891. — *Derselbe* (2), Beitr. z. Kenntn. einh. Pilze II, S. 157. Jena 1895. — *Derselbe* (3), Ber. d. d. bot. Ges. **31**, 210, 1913. — *Weitzel*, Zentralbl. f. Physiol. **28**, 766. 1914. — *Wertheimer*, Fermentforsch. 8, 497, 1926. — *White*, The Lancet **2**, 701, 1921. — *Wieland*, Ann. Chem. Pharm. (Liebig) **434**, 185, 1923. — *Wijkman*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **132**, 104, 1924. — *Willstätter*, Ber. d. d. chem. Ges. **53**, 1152, 1920. — *Willstätter* und *Pfannenstiel*, Ann. d. Chem. **358**, 249, 1908.

Über Veränderungen des Kationengehalts der Organe unter Belichtung und im Höhenklima.

Von

Ludwig Pincussen.

(Aus dem Institut für Hochgebirgsphysiologie in Davos.)

(Eingegangen am 15. Dezember 1926.)

In einer Reihe von Arbeiten ist festgestellt worden, daß der Ionengehalt des Blutes und des Harnes unter Belichtung zum Teil nicht unerhebliche Veränderungen erleidet (1). Insbesondere ist von verschiedenen Seiten gezeigt worden, daß der Calciumgehalt des Blutes unter Bestrahlung vermehrt ist, während die in meinem Berliner Institut gemachte Feststellung, daß beim Menschen der Kaliumgehalt zum Teil sehr erheblich abnimmt (2), ebenfalls als charakteristisch gelten darf. Im Davoser Institut habe ich sodann die Ausscheidungsverhältnisse des Kaliums und Calciums im Harn geprüft und gefunden, daß eine erhöhte Ausschwemmung von Kalium mit einer Retention von Calcium Hand in Hand geht (3). Nun können uns zwar Befunde im Blut und Harn gewisse Anhaltspunkte für die Veränderungen geben, die sich im Mineralstoffwechsel unter Belichtung abspielen. Sie geben naturgemäß keine Auskunft darüber, ob und in welcher Weise Verschiebungen in den Organen vorkommen. Gerade diese sind es, welche uns am meisten interessieren, seitdem wir wissen, daß Veränderungen des Salzgehalts ebenso wie die der Wasserstoffionenkonzentration in höchstem Maße, um bei der augenblicklich üblichen Nomenklatur zu bleiben, sowohl vegetative wie animale Funktionen beeinflussen. Nicht nur die fermentativen Vorgänge sind abhängig von dem Ionengehalt des Milieus, sondern ebenfalls bisher nicht in ähnlicher Weise charakterisierte Funktionen, wie z. B. die Tätigkeit des Herzens.

Aus diesem Grunde erschien es wesentlich, die Frage der Ionenverteilung in verschiedenen Organen zu untersuchen und festzustellen, wie sie sich einerseits unter Lichtwirkung, andererseits unter dem Einfluß des Höhenklimas an sich offenbart. Der Versuchsplan war dementsprechend einfach, indem gleiche Tiere einerseits unter Belichtung, andererseits bei Haltung im Dunkeln untersucht wurden. Da die Erfahrungen gelehrt haben, daß bei diesen Versuchen die Nahrung

eine ausschlagegbende Rolle spielt, wurde in allen Fällen Hafer, der aus einer einzigen größeren Menge entnommen wurde, verfüttert, und zwar 50 g täglich pro Kaninchen. Hiermit kamen die 2000 bis 2500 g schweren Tiere gut aus, wobei ihnen lediglich noch Wasser gegeben wurde. Zum Versuch wurden acht gleiche Tiere derselben Rasse und desselben Alters ausgewählt. Von diesen blieben zwei in Berlin, während sechs auf schnellstem Wege nach Davos gesandt wurden. Dort wurden drei Tiere im dunklen Raume gehalten, während drei andere dem Tages- bzw. Sonnenlicht während 7 Stunden täglich ausgesetzt wurden. 5 Tage nach Ankunft der Tiere wurde das erste Paar, ein im Hellen gehaltenes und ein Dunkeltier, getötet (18. Februar), 10 Tage später das zweite Paar (1. März), während durch ein Versehen das dritte Helltier, welches in der Nacht im Freien gelassen worden war, spontan starb und am 4. März morgens tot aufgefunden wurde. Das dazugehörige Dunkeltier wurde nun, entgegen dem ursprünglichen Plan, welcher eine Frist von 10 Tagen vorgesehen hatte, am nächsten Tage, dem 5. März, getötet. Von den in Berlin zurückgebliebenen Tieren wurde während 2 Wochen das Helltier täglich 20 Minuten mit der Quecksilberquarzlampe in einer Entfernung von 60 cm bestrahlt; diese Bestrahlung ist selbstverständlich nicht einfach mit dem natürlichen Sonnenlicht in Parallele zu stellen, es schien aber die einfachste Art. dem Tiere größte Intensitäten kurzwelligen Lichtes zuzuführen. Das Kontrolltier blieb in einem dunklen Stalle.

An den betreffenden Stichtagen wurden die Tiere durch Entbluten mittels einfachen Durchschneidens des Halses getötet. Eine bestimmte Menge Blut wurde enteiweißt und nun in der gewöhnlichen Weise auf die verschiedenen Kationen verarbeitet. Auf diese Weise war es möglich, die Enteiweißung in Davos, die Analysen in meinem Berliner Institut durchzuführen. Von den getöteten und möglichst vollständig entbluteten Tieren wurden nun die verschiedenen Organe herausgenommen, oberflächlich vom Blute gereinigt und gewogen. Sie kamen dann im ganzen in Glasstöpselflaschen, in welchen sie nach Berlin geschickt wurden, wo die weitere Verarbeitung erfolgte. Eine Ausnahme wurde nur bei der Leber gemacht, von der ein ungefähr 10 g großes Stück herausgeschnitten wurde, das dann in gleicher Weise behandelt wurde. Das Herz wurde aufgeschnitten, um das Blut nach Möglichkeit zu entfernen.

Die weitere Verarbeitung gestaltete sich nun so, daß die in den Gläsern aufbewahrten Organteile mit einer reichlichen Menge konzentrierter Salpetersäure übergossen wurden, wodurch in Stunden bzw. wenigen Tagen das ganze Gewebe zerstört wurde. Darauf wurden die Massen unter wiederholtem Nachspülen quantitativ in einen Mikrokjeldahlkolben überführt und nunmehr unter Zugabe von Wasserstoffsuperoxyd nach den Angaben von *Pincussen* und *Cronheim* (4) die Veraschung ausgeführt [1]). Die von Salpetersäure freien, schwach salzsauren Lösungen wurden dann

[1]) Bei den Analysen hat mich Herr stud. phil. ***Herbert Stein*** in eifrigster Weise unterstützt.

auf ein bestimmtes Volumen aufgefüllt und passende Mengen für die einzelnen Analysen verwendet. In den nachfolgenden Tabellen ist nur der Prozentgehalt der betreffenden Organe an den verschiedenen Kationen angegeben, da ja der Gehalt des ganzen Organs kaum interessiert. Es war zunächst beabsichtigt, außer den Analysen für Blut, Lunge, Leber, Gehirn und Herz auch die der Milz, der Nebenniere und der Niere auszuführen. Bei den beiden ersteren schienen mir die Wägungen nicht exakt genug, um daraufhin irgendwelche Schlüsse zu begründen. Bei der Niere ist es denkbar, daß die Resultate durch Harn und Blutgehalt doch nicht unerheblich gefälscht sein können; sie mögen daher nur auszugsweise mitgeteilt sein. Auch betreffs der Haut scheinen mir die Versuche, die aus äußeren Gründen nur an den Berliner Kontrolltieren und den letzten Davoser Tieren angestellt worden sind, nicht ganz beweiskräftig. Die Frage ist wichtig genug, um nochmals ganz besonders aufgerollt zu werden. Ich möchte es auch als nicht korrekt bezeichnen, wie ich es in diesem Falle getan habe, nur ein Stückchen Haut zu entnehmen; es müßte vielmehr eine größere Partie oder auch mehrere Stücke aus verschiedenen, korrespondierenden Gegenden der Analyse zugrunde gelegt werden.

Was die erhaltenen Resultate anbetrifft, so ist aus den Tabellen das Wichtigste zu ersehen. Diese geben die absoluten Mengen des Kaliums, Calciums und Magnesiums in Milligrammen auf 100 g lebensfrische Substanz und ferner, was besonders interessant sein dürfte, das Verhältnis der verschiedenen Kationen zueinander, das Verhältnis Kalium : Calcium und dasjenige von Calcium : Magnesium. Diese Zahlen betrachte ich als besonders wichtig, da ja gerade die Mischung der Kationen das Wesentliche für die schon oben erwähnten Lebensvorgänge darstellt.

Tabelle I ergibt zunächst die Verhältnisse im Blute.

Tabelle I (Blut).

	H_{Berlin}	D_{Berlin}	H_{18}	D_{18}	H_1	D_1
K	17,3	17,3	15,8	15,4	16,1	19,7
Ca	24,6	23,0	19,2	18,4	21,8	22,2
Mg	7,4	9,8	5,20	6,65	4,47	6,2
K/Ca	0,705	0,75	0,825	0,84	0,745	0,87
Ca/Mg	3,72	2,37	3,7	2,77	4,62	3,57

Bei dieser Tabelle fehlen die Daten für die letzten Davoser Tiere, weil bei dem einen infolge spontanen Todes kein Blut erhalten werden konnte und deshalb auch die Kontrollen fortfielen. Im übrigen zeigt sich, daß die Dunkel-Kaliumwerte im Hochgebirgsklima zunächst abnehmen, um später wieder erheblich anzusteigen. Die Unterschiede Hell und Dunkel sind beim Kaninchen nicht deutlich; nur bei den Tieren H_1 und D_1 ist die Abnahme im Lichte eklatant. Der Calciumwert ist beim Berliner Tier recht hoch, er nimmt nach kurzem Aufenthalt im Höhenklima zunächst ab, um später wieder zu steigen. Beim Berliner

Tiere sowohl wie bei den ersten Davoser Tieren nimmt das Calcium bei Belichtung zu. Das Magnesium endlich zeigt im Hochgebirgsklima ständige Verminderung gegenüber dem Berliner Tiere: Belichtung setzt in jedem Falle die Magnesiummenge herab. Was die Quotienten betrifft, so ist das Verhältnis Kalium : Calcium in jedem Falle im Lichte gegenüber den Dunkelproben vermindert, das Verhältnis Calcium : Magnesium im Lichte stets höher. Diese Relation nimmt sowohl bei den Dunkeltieren wie bei den Lichttieren ständig zu, so daß es in Berlin in jedem Falle am niedrigsten ist. Als Resultat ist also hier zu buchen, daß bei diesen Veränderungen sowohl der Ortswechsel wie auch die Belichtung mitspricht. Bemerkt sei noch, daß dieser im Hochgebirgsklima erhöhte Quotient Calcium-Magnesium gewisses Interesse dadurch gewinnt, daß er gegensätzlich gerichtet ist wie der gleiche Quotient im Blute bei Narkose, der, wie von *Pincussen* und *Dimitrijevič* (5) gezeigt worden ist, höher ist als bei unbehandelten Tieren. Von *Loewy* ist neuerdings darauf aufmerksam gemacht worden, daß die Resistenz gegen Narkotica im Höhenklima deutlich gesteigert ist (6). Da nun, wie obige Zahlen lehren, im Blute der Hochgebirgstiere das Calcium sehr stark überwiegt, ist wohl die Hypothese möglich, daß die erhöhte Resistenz gegenüber den Narkoticis damit im Zusammenhang steht, daß es unter diesen Umständen schwerer ist, den für die Narkose charakteristischen Ca : Mg-Quotienten mit relativem Überwiegen des Magnesiums zu erreichen.

Tabelle II zeigt die Verhältnisse bei der Lunge (Werte stets mg-Proz.)

Tabelle II (Lunge).

	H_{Berlin}	D_{Berlin}	H_{18}	D_{18}	H_1	D_1	H_4	D_5
K	328	325	195	196	220	234	266	226
Ca	18,4	18.3	14,3	13.1	17.4	20.2	49	23.5
Mg	12,8	11,3	11.5	11,4	9,05	11,1	9.6	10.5
K/Ca . . .	17,8	17.8	13.6	13.0	12,6	11,6		9.6
Ca/Mg . .	1,44	1,61	1.24	1.15	1,83	1.83		2.23

Die Kaliumwerte sind gegenüber den Berliner Kontrollen deutlich vermindert, um dann langsam wieder anzusteigen. Ähnlich ist es mit den Calciumwerten, während die Magnesiumwerte annähernd konstant bleiben. Die Differenzen Hell und Dunkel sind für das Kalium gering, auch für das Calcium nur zum Teil beträchtlich, so daß eine Lichtwirkung in den meisten Fällen gar nicht in die Erscheinung tritt. Sehr deutlich sind aber die Veränderungen des Quotienten Kalium : Calcium, welche sich sowohl aus den Dunkel- wie aus den Lichtproben — beide zeigen kaum eine Differenz — ablesen lassen. Gegenüber Berlin zeigen die Davoser Tiere mit zunehmendem Aufenthalt in der Höhe eine

deutliche Verminderung dieses Quotienten, der schließlich nur noch 54 Proz. des in Berlin festgestellten beträgt. Diese Erhöhung der Calciumwerte in der Lunge ist immerhin von Interesse, wenn man die Bedeutung kennt, welche das Hochgebirge für die Heilung der Tuberkulose besitzt. Ein solcher Austausch dieser antagonistischen Ionen untereinander dürfte als Beweis dafür gewertet werden, daß das Hochgebirge eine Tendenz zu erhöhtem Kalkansatz hervorruft; in welcher Weise der Kalk in der Lunge gebunden ist, läßt sich nicht sagen, da die Methode ja die ganze Kalkmenge erfaßt. Die sehr hohe Kalkmenge beim spontan gestorbenen Tiere H_4 läßt ebenso wie die hier gleichfalls sehr hohe Relation Ca:Mg, bei unveränderter Magnesiummenge ohne Nachprüfung einen Schluß nicht zu.

Tabelle III (Gehirn).

	H_{Berlin}	D_{Berlin}	H_{18}	D_{18}	H_1	D_1	H_4	D_5
K	375	360	377	297	326	303	367	333
Ca	37,9	109	18,9	58	87	52	78	61,5
Mg	14,2	15,6	13,9	12,0	13,0	13,9	13,8	13,3
K/Ca . . .	9,3	3,3	20,0	5,1	3,75	5,8	4,7	5,4
Ca/Mg . .	2,67	7,0	1,36	4,85	6,70	3,73	5,52	4,62

Die Befunde beim Gehirn werden in Tabelle III geschildert. Sie ergeben eine anfängliche Abnahme, dann wieder Zunahme der Dunkelwerte und eine regelmäßig vorhandene, wenn auch in ihrem Ausmaß wechselnde Erhöhung des Kaliums bei den Helltieren. Die Werte des Calciums sind derartig wechselnd, daß eine Analyse nicht möglich erscheint. Bei den Berliner Tieren sowie bei den ersten Davoser Tieren (H_{18} und D_{18}) sind die Werte bei den Dunkelkontrollen sehr erheblich höher, ganz anders wie bei den anderen Davoser Tieren. Bei den Dunkeltieren der höchste Wert in Berlin, sehr starke Abnahme in Davos, die zunächst noch höher wird, um dann einer geringen Zunahme Platz zu machen. Ob diese Dinge ebenso wie die entsprechenden Veränderungen des Quotienten Kalium : Calcium als eine Art Bergkrankheit zu deuten sind, bleibe dahingestellt. Es muß jedenfalls als auffällig die Zunahme des Calciums im Lichte nach anfänglich umgekehrtem Verhalten gebucht werden. Die Magnesiumwerte sind sehr wenig charakteristisch, sie sind bei den Hochgebirgstieren nur wenig niedriger als bei den Berliner Tieren, auch die Ausschläge zwischen Hell und Dunkel sind nur unbedeutend.

Die Befunde an der Leber sind verhältnismäßig sehr bedeutend.

Das Kalium der Dunkeltiere ist im Hochgebirge vermindert, der Einfluß der Belichtung, was die absoluten Werte anbetrifft, nicht gleichmäßig, indem in Berlin eine Abnahme, im Höhenklima eine

Tabelle IV (Leber).

	H_{Berlin}	D_{Berlin}	H_{18}	D_{18}	H_1	D_1	H_4	D_5
K	281	350	346	292	293	275	302	212
Ca	7,6	12,3	7,8	8,1	8,8	10,1	10,9	13,7
Mg	16,7	18,8	19,0	18,8	16,9	17,1	18,2	19,1
K/Ca . . .	37	28,5	44,5	36	33,2	27,2	27,7	15,5
Ca/Mg . .	0,46	0,65	0,41	0,43	0,52	0,59	0,60	0,72

Zunahme beobachtet wird. Der Calciumwert nimmt in der Höhe ab, um dann sehr langsam wieder anzusteigen. Bei den Helltieren ist der Calciumgehalt in jedem Falle niedriger als bei den Kontrollen, wenn auch in verschiedenen Ausmaßen. Wichtig ist der Gang der Relation Kalium-Calcium. Ihr Wert nimmt beim Dunkeltier erst zu, dann wieder ab, um schließlich weit unter das ursprüngliche Niveau zu fallen. Vergleicht man das Verhältnis Kalium : Calcium bei Hell- und Dunkeltieren, so ist es in jedem Falle beim Helltier höher, und zwar beim Berliner Tiere um 30 Proz., bei den letzten Davoser Tieren sogar um fast 80 Proz. Daß solche gewaltigen Umstellungen im Lichte von weittragenden Folgen für den Fermentstoffwechsel begleitet sein müssen, besonders wenn sie in einem so wichtigen Organ wie der Leber vor sich gehen, liegt auf der Hand. Das Verhältnis Calcium : Magnesium ist dagegen in jedem Falle im Lichte gegenüber den im Dunkeln gehaltenen Tieren verringert.

Endlich das Verhalten der Kationen im Herzen.

Tabelle V (Herz).

	H_{Berlin}	D_{Berlin}	H_{18}	D_{18}	H_1	D_1	H_4	D_5
K	357	325	188	289	315	365	238	295
Ca	9,4	16,1	7,2	14,25	13,35	15,0	14,15	14,0
Mg	5,0	5,95	1,7	4,95	—	3,03	2,13	5,45
Ca/Mg . .	38	20,8	26,1	19,9	23,6	24,2	16,9	21,1

Hier spielen augenscheinlich auch Höhenklima und Strahlung eine Rolle. Die Abnahme des Kaliums bei den Dunkeltieren ist nicht sehr erheblich, wogegen die Differenz zwischen Hell- und Dunkeltieren in Berlin zugunsten des Helltieres, in Davos in jedem Falle zugunsten des Dunkeltieres ausfällt. Das Calcium der Dunkeltiere nimmt ein wenig ab; bei den Helltieren sieht man den stärksten Effekt der Bestrahlung bei dem Berliner Tiere und den ersten Davoser Tieren, wo das Calcium ungefähr nur die Hälfte wie bei den Dunkeltieren beträgt: dagegen ist bei den H_1-Tieren eine sehr geringe Abnahme, bei dem spontan zugrunde gegangenen H_4-Tier keine Veränderung zu bemerken. In ganz ähnlicher Weise schwanken auch die Magnesiumwerte, so daß

darauf weiter nicht eingegangen wird. Das Verhältnis Kalium zu Calcium ist am höchsten gesteigert bei dem Berliner Helltier; es folgt in weitem Abstand das erste Davoser Tierpaar, während späterhin zwischen Hell und Dunkel ein Unterschied nicht zu konstatieren ist, bei den letzten Tieren sogar ein Überwiegen beim Dunkeltier. Diese Verhältnisse sind vorläufig recht wenig durchsichtig. Ich habe früher bei klinischen Versuchen gelegentlich festgestellt, daß von Herzkranken (Überleitungsstörungen) Bestrahlung sehr schlecht vertragen wurde und sehr unangenehme vagotonische Beschwerden auftraten. Es ist wohl denkbar, daß zwischen der Kaliumsteigerung bei Bestrahlung und diesen Symptomen ein Zusammenhang besteht. Warum freilich im Hochland diese Dinge weniger ausgeprägt sein sollen, läßt sich auch mutmaßungsweise nicht sagen.

Bezüglich der Haut sei erwähnt, daß die Kaliumwerte beim Berliner Helltier niedriger waren als beim Dunkeltier und daß bei den Davoser Tieren das Verhalten entgegengesetzt war. Das gleiche gilt für das Calcium, wo ebenfalls das Berliner Dunkeltier, das Davoser Helltier die höheren Werte zeigte. Immerhin lagen in beiden Vergleichsproben die Relationen Kalium : Calcium so, daß beim Dunkeltier, wenn auch in verschiedenem Maße, das Kalium überwog. Aus den bereits oben genannten Gründen soll auf diese Verhältnisse kein besonderer Wert gelegt werden.

Diese Versuche, die an verhältnismäßig wenigen Tieren ausgeführt worden sind, machen nicht den Anspruch darauf, die Frage der Verteilung der einzelnen Ionen in den Organen definitiv und absolut zu klären. Es ist wohl denkbar, daß gewisse Verhältnisse, die man nicht beherrscht, die Resultate in einzelnen Fällen modifiziert haben. Mit Deutlichkeit zeigen sie aber, daß unter Einwirkung des Höhenklimas und des Lichtes ganz erhebliche Verschiebungen im Mineralgehalt des Organismus vor sich gehen und daß auch die Frage der Gewöhnung an das Höhenklima (Akklimatisation) vielleicht hierdurch einer Deutung näher gebracht wird.

Literatur.

1) *L. Pincussen*, Handb. d. Biochem., 2. Aufl., 7, 1926. — 2) *J. Makrineos*, diese Zeitschr. **161**, 61, 1925. — 3) *L. Pincussen*, ebendaselbst **161**, 67, 1925. — 4) *L. Pincussen* und *G. Cronheim*, ebendaselbst **171**, 7, 1926. — 5) *L. Pincussen* und *H. N. Dimitrievič*, Klin. Wochenschr. 1926, S. 849. — 6) *A. Loewy*, Der heutige Stand der Physiologie des Höhenklimas. Berlin, Julius Springer, 1926.

Über Beeinflussung biologischer Lichtwirkungen.

Von

Ludwig Pincussen.

(Aus der biologisch-chemischen Abteilung des städtischen Krankenhauses am Urban, Berlin.)

(Eingegangen am 15. Dezember 1926.)

Die Wirkung, welche das kurzwellige Licht besonders auf tieferstehende Organismen ausübt, erfolgt hauptsächlich im Sinne einer Schädigung. Bei der Anwendung genügend starker Intensitäten solcher Strahlung gehen bei längerer Belichtung die Organismen zugrunde. Ganz ähnlich wie ganze Tiere verhalten sich auch gewisse Organe, bei welchen ebenfalls eine mehr oder weniger große Schädigung durch das Licht erzeugt wird. Nach den Versuchen von *Tappeiner* und *Jodlbauer*, die in der Folge auch von anderer Seite erweitert worden sind, läßt sich die Lichtwirkung sehr erheblich steigern, wenn der Flüssigkeit, in welcher sich die niederen Organismen befinden, gewisse Farbstoffe, besonders fluoreszierende, zugesetzt werden. Während unter solchen Verhältnissen im Dunkeln gehaltene Tierchen ebensowenig beeinflußt werden wie in einfachem Wasser, wirkt bei Lichtzutritt diese „Sensibilisierung" so, daß in erheblich kürzerer Zeit als sonst eine Aufhebung der Lebensfunktionen, bei kleinen Tieren sogar der Tod eintritt. In einer Reihe von Arbeiten der letzten 14 Jahre habe ich versucht, diese Sensibilisierung experimentell für die Beeinflussung des Stoffwechsels höherer Tiere zu verwerten, während von anderer Seite, vor allem von *Pfeiffer* und *Hausmann*, dargetan worden ist, daß unter solchen Umständen auch andere tiefgreifende Veränderungen auftreten [Literatur über alle diese Dinge bei (1)]. Eine Erklärung der Erscheinungen bei photodynamischer Sensibilisierung steht bisher noch aus; nach meinen Erfahrungen handelt es sich bei der Beeinflussung des Stoffwechsels im wesentlichen um eine Steigerung der Oxydationsvorgänge, der natürlich andere Phänomene teils koordiniert, teils subordiniert sein dürften.

Eine Modifikation der Empfindlichkeit von Organismen gegenüber der Lichtwirkung kann nun auch auf eine andere Weise erfolgen, welche viel genauer präzisiert werden kann. An Fermenten konnte ich nach-

weisen, daß die Wirksamkeit der Strahlung auf diese bedingt ist durch ihre Dispersität, daß feindisperse Systeme in höherem Maße durch das Licht geschädigt werden als solche, die in gröberem Zustande vorhanden sind, und daß die Fermentwirkung am stärksten dann geschädigt wird, wenn sich die Enzyme im optimalen Punkte befinden. Gewisse Zusätze, welche die Dispersität vergröbern, dadurch freilich auch die Wirkung an sich verkleinern, lassen die Schädigung durch die Strahlung auch relativ in sehr verringertem Maße in die Erscheinung treten. So ist z. B. Salzzusatz zu Fermentlösungen infolge seiner vergröbernden Wirkung geeignet, die Strahlenempfindlichkeit herabzusetzen. Neben dieser allgemeinen Salzwirkung wurden auch spezifische Ionenwirkungen festgestellt, deren charakteristischste die des Jodions war. Aus Jodidlösungen wird im Lichte Jod abgespalten, und dieses wirkt augenscheinlich sehr schädigend auf die fermentative Wirkung ein, wenn auch in verschiedenem Ausmaß, wie ich an Diastasen zeigen konnte (2).

Diese Erfahrungen ließen es erwünscht erscheinen, auch an Organismen die Wirkung gerade des Jods näher zu untersuchen. Im Frühjahr 1925 ausgeführte Untersuchungen an Kaulquappen, vor allem aber an Daphnien, haben nun gezeigt, daß auch hier dem Jod eine äußerst schädigende Wirkung zukommt. Die Versuche, welche in den Tabellen I und II dargelegt werden, zeigen diese Tatsache. Die Versuche wurden einfach so angestellt, daß die Tiere in zwei Partien in Jodalkalilösungen — im wesentlichen Jodkalilösungen — eingesetzt wurden, daß eine Partie im Dunkeln blieb, während der andere Teil in offener Schale dem Lichte ausgesetzt wurde, und zwar zeigt Tabelle I die Resultate bei Anwendung von Sonnenlicht, Tabelle II die bei Bestrahlung mit Quarzlampe.

Tabelle I.

Daphnien in Jodkaliumlösung (100 ccm) in hellem, diffusem Lichte (23. Jun 1925). Anfang 12 Uhr.

Konzentration Proz.	Nach 1 Stunde	Nach 1 Stunde 50 Min.	Nach 2 Stunden 30 Min.
0.1	viele †	fast alle †	alle †
0.1 (Kontrolle)	viele †	einige leben	einzelne leben
0.05		meiste †	fast alle †
0.05 (Kontrolle)		etwa 1/3 †	etwa 1/2 leben
0.02		etwa 1/2 †	etwa 3/4 †
0.02 (Kontrolle)		meiste leben	meiste leben
0.01		etwa 1/2 †	etwa 1/2 †
0.01 (Kontrolle)		fast alle leben	meiste leben
0.005		etwa 1/3 †	etwa 1/3 †
0.005 (Kontrolle)		fast alle leben	fast alle leben
Wasser		etwa 1/3 †	etwa 1/3 †
Wasser (Kontrolle)		wenige †	wenige †

Tabelle II.

Daphnien im Quarzkolben in 0,05proz. JK-Lösung.

	Nach 48 Min.	Nach 60 Min.
a) Belichtet durch Quarzlampe, 50 V., 2 Amp. an den Klemmen, 15 cm Abstand	alle leben	ungefähr 1/2 †
b) Dunkelkontrolle	„ „	fast alle leben

Es ist über diese Tabellen nicht viel zu sagen; während bei sehr hohen Konzentrationen eine gewisse Schädigung auch bei den Dunkeltieren beobachtet wird, ist bei niederen Konzentrationen kein Unterschied der in Jodalkalilösung eingesetzten Tiere gegenüber den Kontrollen in Wasser festzustellen, während die im Hellen gehaltenen Tiere in weit höherem Maße als die Dunkeltiere absterben. Dieselben Erscheinungen zeigt Versuch 2, wo die Tiere in einem Quarzkolben mit der Qecksilberquarzlampe bei Verwendung einer 0,05proz. Jodkaliumlösung bestrahlt wurden; schon nach 1 Stunde waren die meisten Lichttiere abgetötet.

Diese Abtötung unter Lichteinfluß schien sehr wahrscheinlich durch die Abspaltung von Jod bedingt, welches, von den Tieren aufgenommen — in der Flüssigkeit wurde freies Jod nicht nachgewiesen —, nun weitere Prozesse zur Folge hatte, die schließlich zum Tode führten. Die Abspaltung von Jod aus Jodidlösungen im Lichte, deren Ausmaß von verschiedenen Faktoren abhängig ist, wird auch gesteigert durch Zugabe gewisser fluoreszierender Farbstoffe, und zwar gelingt dann, wie ich gezeigt habe, eine Abspaltung schon durch langwelligere Strahlen, welche ohne die Sensibilisatoren zur Freisetzung von Jod nicht befähigt sind. Es war also anzunehmen, daß bei Zusatz sensibilisierender Substanzen infolge der Steigerung der Jodabspaltung noch eine stärkere Reaktion erfolgen müßte. Solche Versuche sind in den Tabellen III bis V geschildert, und zwar im Sonnenlicht sowie bei Beleuchtung mit der Quarzlampe unter Anwendung der sehr wirksamen Sensibilisatoren Eosin und dichloranthracendisulfosaures Natrium. Es ist charakteristisch, daß bei dem in Frage kommenden Testobjekt die fluoreszierenden Farbstoffe an sich so gut wie keine Wirkung hatten, daß also die Abtötung der Tiere lediglich auf die JK-Spaltung zurückzuführen war. Bemerkt sei noch, daß die Temperatur der Licht- und Dunkelproben gleich hoch gehalten wurde.

Es lag nahe, aus den genannten Versuchen den Schluß zu ziehen, daß das als starker Schädling bekannte Jod allein für diese starke Wirkung anzuschuldigen war; es war nur erforderlich, eine verstärkte Oxydation durch das freigesetzte Jod anzunehmen, aus welcher sich die ganzen Erscheinungen erklärten. Daß Jod außerordentlich stark wirksam ist, hatte sich aus hier nicht näher auszuführenden Versuchen

Tabelle III.

Daphnien im Quarzkolben in 100 ccm 0,05proz. JK-Lösung + 1 ccm 1proz. Eosin, bläulich.

	Nach 12 Min.	Nach 40 Min.	Nach 2 Stdn. (ohne weitere Bestrahlung)
a) Belichtet durch Quarzlampe. 15 cm Abstand	alle leben	einzelne †	alle †
b) Dunkelkontrolle	„ „	alle leben	fast alle leben

Tabelle IV.

Daphnien in offenen Schalen in 100 ccm n/1000 JK-Lösung im Sonnenlicht (26. Juni 1925).

	Nach 2 Stunden Sonnenlicht	Nach 2 weiteren Stdn. diffusem Licht
n/1000 JK-Lösung	meiste †	alle †
Desgl., Kontrolle	etwa 1/3 †	etwa 1/2 †
+ 0,5 ccm 1proz. Eosinlösung	alle †	alle †
Desgl., Kontrolle	etwa 1/3 †	etwa 1/3 †
+ 1,0 ccm 1proz. Eosinlösung	alle †	alle †
Desgl., Kontrolle	etwa 1/3 †	etwa 1/3 †
+ 2,0 ccm Eosinlösung	alle †	alle †
Desgl., Kontrolle	meiste leben	meiste leben
Wasser + 1,0 ccm Eosinlösung	2/3 leben	2/3 leben
Desgl., Kontrolle	meiste leben	meiste leben
+ 2,0 ccm Eosinlösung	etwa 2/3 leben	etwa 2/3 leben
Desgl., Kontrolle	meiste leben	meiste leben

Tabelle V.

Daphnien in 100 ccm n/1000 JK-Lösung in offenen Schalen im Sonnenlicht (27. Juni 1925).

	Nach 90 Minuten
n/1000 JK-Lösung, hell	großer Teil †
Desgl., dunkel	fast alle leben
+ 0,5 ccm 0,1 proz. dichloranthracendisulfos. Na	alle †
Desgl., dunkel	fast alle leben
+ 1,0 ccm dichloranthracendisulfos. Na	alle †
Desgl., dunkel	fast alle leben
+ 2,0 ccm dichloranthracendisulfos. Na	alle †
Desgl., dunkel	fast alle leben
+ 5 ccm dichloranthracendisulfos. Na	alle †
Desgl., dunkel	fast alle leben
Wasser + 1,0 ccm dichloranthracendisulfos. Na	„ „ „
Desgl., dunkel	„ „ „
+ 5,0 ccm dichloranthracendisulfos. Na	„ „ „
Desgl., dunkel	„ „ „

ergeben, bei welchen andere Jodide angewandt worden waren, auch hat für die Schädigung der Katalase *Seligsohn* in meinem Institut den sehr starken Einfluß des aus einem organischen Jodpräparat abgespaltenen Jods nachweisen können. Es wurde trotzdem in diesem Jahre unter

Benutzung von Kaulquappen als Testobjekt geprüft, ob die schädigende Wirkung lediglich der Jodkomponente zuzuschreiben ist, und aus diesem Grunde systematisch die verschiedenen Anionen und Kationen auf ihren Einfluß bei der Lichtwirkung untersucht. Es war schon früher, wie bereits angegeben, festgestellt worden, daß sämtliche Jodsalze schädigend wirken, es fehlte aber der Nachweis, ob die mit dem Kalium verbundenen Anionen in ähnlicher Weise wie das Jodion wirkten, ob also auch dem Kalium eine in der gedachten Beziehung wichtige Rolle zuzuschreiben ist. Den ersten Versuch über diese Frage schildert Tabelle VI.

Tabelle VI.

Kaulquappen (Frosch) in 100 ccm n/20 Lösung, 10 Minuten belichtet durch Quarzlampe, 2 Amp. (offene Schalen).

	Nach 40 Min.		Nach 40 Min.
KCl-Lösung . . .	6 †, 2 leben	K_2SO_4-Lösung .	alle †
Desgl., dunkel . .	alle leben	Desgl., dunkel . .	alle leben
KBr-Lösung . . .	6 †, 1 lebt	K_2HPO_4-Lösung	3 †, 5 leben
Desgl., dunkel . .	alle leben	Desgl., dunkel . .	alle leben
KJ-Lösung	alle †	Wasser, hell . . .	„ „
Desgl., dunkel . .	alle leben	„ dunkel . .	„ „

Aus ihr ergibt sich die in vielen anderen Versuchen bestätigte Tatsache, daß Kaulquappen, dem Quarzlicht ausgesetzt, in allen Kaliumsalzen — die angewandte Konzentration war n/20 — verhältnismäßig schnell absterben, daß, während die Wasserkontrollen im Hellen am Leben blieben, die Dunkelkontrollen in den gleichen Salzlösungen ebenfalls überleben, die Helltiere nach längerer oder kürzerer Zeit zugrunde gehen, wobei freilich gewisse Abhängigkeiten vom Anion vorhanden sind. So ist das Kaliumjodid in der Tat am wirksamsten, während das Bromid und das Chlorid sich ein wenig, das saure Phosphat sich erheblich günstiger verhält. Sehr groß sind die Unterschiede bei der angewandten Intensität nicht, und es ist nur das Phosphat, welches einen gewissen Schutz zu gewähren scheint, trotz der verhältnismäßig alkalischen Reaktion, welche, wie später gezeigt werden wird, einen ungünstigen Einfluß hat.

Nachdem auf diese Weise der sehr erhebliche Einfluß des Kaliumions festgestellt worden war, wurde zur weiteren Klärung der Rolle der Anionen ein entsprechender Versuch mit Natriumsalzen angestellt. Hier sind die Ausschläge für die Anionen erheblich kleiner, wie Tabelle VII zeigt.

Aus ihr ergibt sich sehr klar die Rolle des Jodions; während das Chlorion absolut unschädlich, das Bromion außerordentlich wenig schädigend einwirkt, ist die Wirkung des Jods eine sehr starke, und im Gegensatz zu den sonst meist gefundenen Reihen steht das Fluor

Tabelle VII.

Kaulquappen in n/10 Lösungen in offenen Schalen. Belichtung durch 220-Volt-Quarzlampe, 10 Minuten.

	Nach 60 Min.		Nach 60 Min.
NaCl-Lösung . . .	alle leben	NaFl-Lösung . .	alle †
Desgl., dunkel . . .	„ „	Desgl., dunkel . .	„ †
NaBr-Lösung . . .	1 †, andere leben	Wasser	alle leben
Desgl., dunkel . . .	alle leben	„ dunkel . .	„ „
NaJ-Lösung . . .	alle †		
Desgl., dunkel . . .	2 †, 6 leben		

nicht beim Chlor, sondern beim Jod; hier besteht aber die Abnormität, daß auch die Dunkeltiere in verhältnismäßig großer Menge zugrunde gehen, während bei den anderen Anionen die Dunkeltiere überleben.

Es fragt sich nun, wie unter den Kationen das Kalium in der Reihe steht, insbesondere wie die verschiedenen Kationen an das als gewissermaßen indifferente Anion, das Chlor, gebunden sich verhalten. Solche Versuche sind in den Tabellen VIII und IX geschildert.

Tabelle VIII.

Temporariaquappen in 100 ccm Lösung. 10 Miunten belichtet in offenen Schalen.

	Nach 20 Stunden	Nach 44 Stunden
Wasser	1 †, 9 leben	unverändert
Desgl., dunkel	alle leben	alle leben
n/50 NaCl	„ „	2 †, 8 leben
Desgl., dunkel	„ „	alle leben
n/50 KCl	8 †, 2 leben	alle †
Desgl., dunkel	alle leben	alle leben
n/50 $CaCl_2$	1 †, 9 leben	unverändert
Desgl., dunkel	1 †, 9 leben	„

Dieser Versuch, der lediglich mit einigen Salzen ausgeführt worden ist, zeigt sehr deutlich, daß, wenn man Lösungen ohne Salzzusatz als Paradigma nimmt, das Natriumsalz keinen irgendwelchen nennenswerten Unterschied zeigt, das Kalium' in gleicher Konzentration außerordentlich schädlich wirkt, das Calcium im Gegenteil eher günstiger. Die hier gewählten Konzentrationen ergaben bei den Dunkeltieren in keinem Falle eine Schädigung.

Dieser Versuch ist noch erweitert in der Anordnung der Tabelle IX.

Hier zeigt sich die schädigende Beeinflussung, wenn man die Kationen nach zunehmender Schädigung ordnet, in folgender Reihe:

$$\text{Ca, Na,} < \text{Al} < \text{Sr} < \text{Mg} < \text{Li} < \text{K.}$$

Es steht also das Calcium an einem, das Kalium am anderen Ende der Reihe, das Lithium auffälligerweise — das ist in vielen Versuchen

Tabelle IX.

Kaulquappen von Bufo in n/10 Lösungen, belichtet in offenen Schalen an zwei aufeinanderfolgenden Tagen je 8 Minuten mit Quarzlampe.

	1 Stunde	20 Stunden
	nach zweiter Belichtung	
NaCl-Lösung	alle leben	alle leben
Desgl., dunkel	„ „	„ „
KCl-Lösung	alle †	alle †
Desgl., dunkel	6 †, 4 leben	7 †, 3 leben
LiCl-Lösung	alle †	alle †
Desgl., dunkel	alle leben	
$MgCl_2$-Lösung	alle †	alle †
Desgl., dunkel	alle leben	1 †, andere leben
$CaCl_2$-Lösung	„ „	8 leben, 2 †
Desgl., dunkel	„ „	alle leben
$SrCl_2$-Lösung	4 leben, 6 †	9 †, 1 lebt
Desgl., dunkel	alle leben	1 †, 9 leben
Al_2Cl_3-Lösung	3 leben, 6 †	alle †
Desgl., dunkel	alle leben	alle †
Wasser	„ „	1 †, 9 leben
Desgl., dunkel	„ „	alle leben

bestätigt worden — ganz in der Nähe des Kaliums. Wir haben also für Anionen und Kationen ganz charakteristische Reihen vor uns, wie sie auch für andere biologische Prozesse gefunden worden sind. Die Reihe der Anionen: $Cl < Br < SO_4 < Fl$, J entspricht im wesentlichen der von *Höber* (4) für die Hämolyse von Rinderblut durch Natriumsalz am ersten Tage angegebenen Reihe, während die Kationenreihen durchaus dem üblichen Schema entsprechen, was besonders klar wird, wenn man die einwertigen und zweiwertigen Ionen untereinander betrachtet. Mit Barium konnten bei der im allgemeinen angenommenen Versuchsanordnung keine Resultate gewonnen werden, da die Tiere auch im Dunkeln eingingen, das gleiche gilt für das Anion NO_3.

Bei meinen Untersuchungen über die Wirkung der Strahlung auf Fermente habe ich auch gezeigt — es wurde schon oben erwähnt —, daß Salzzusatz zu den Lösungen einen gewissen unspezifischen Schutz ausübt, augenscheinlich infolge der auftretenden Dispersitätsvergröberungen. Etwas Ähnliches ist in gewissem Maße auch in diesen Versuchen an Kaulquappen der Fall. Bringt man die Tiere in eine verhältnismäßig günstige Phosphatpufferlösung, so beobachten wir auch hier, wie Tabelle X zeigt, unter Umständen eine Schutzwirkung.

Zu hohe Salzkonzentrationen erweisen sich in jedem Falle für das Leben der Tiere als schädlich. In einer m/3 Phosphatlösung sterben sowohl die Hell- wie auch die Dunkeltiere ab, und zwar im Lichte etwas schneller als in der Dunkelheit. Ähnliches findet in m/6 Lösungen statt, während in verdünnteren Phosphatlösungen ein sehr erheblicher

Tabelle X.

Kaulquappen in Phosphatmischungen, p_H 5,91. Bestrahlung 20 Minuten.

	Nach 10 Minuten	Nach 60 Minuten	Nach 120 Minuten
m/3 Phosphat	alle †		
Desgl., dunkel	6 †, 3 leben	alle †	
m/6 Phosphat		alle †	
Desgl., dunkel		alle leben	alle leben
m/12 Phosphat	alle leben	" "	2 †, 8 leben
Desgl., dunkel	" "	" "	alle leben
m/24 Phosphat	" "	" "	" "
Desgl., dunkel	" "	" "	" "
m/48 Phosphat	" "	" "	" "
Desgl., dunkel	" "	" "	" "
Wasser	" "	5 †, 3 leben	2 leben
Desgl., dunkel	" "	alle leben	alle leben

Schutz gegenüber der Bestrahlung im Vergleich mit Wasser festzustellen ist. Es dürfte kaum ein Zweifel sein, daß hier ähnliche Prozesse obwalten wie bei der vorher geschilderten Wirkung der verschiedenen Ionen, daß es sich also auch hier um Dispersitätsvergröberungen handelt, unter deren Wirkung ein Schutz gegen die Strahlung erzielt wird. Sowohl die unspezifische Wirkung des Salzes an sich wie die spezifische des Ions vermag also eine Verminderung bzw. Zunahme der Strahlenempfindlichkeit auszulösen.

In ganz ähnlicher Weise dürfte der Einfluß zu deuten sein, den die Wasserstoffionenkonzentration der Lösung auf die Tiere ausübt. Bringt man, wie Tabelle XI zeigt, die Kaulquappen in eine Phosphatpufferlösung gleicher Konzentration, jedoch von wechselndem p_H, so ergeben sich charakteristische, zunächst unerwartete Verhältnisse.

Tabelle XI.

Quappen in m/50 Phosphatlösungen, 10 Minuten (15 cm Entfernung) in offenen Schalen belichtet.

p_H der Lösung	3 Stdn. nach Belicht.	p_H der Lösung	3 Stdn. nach Belicht.
5,91	alle leben	7,15	3 †, 4 leben
5,91, dunkel	" "	7,15, dunkel . . .	alle leben
6,47	" "	7,65	4 †, 3 leben
6,47, dunkel	" "	7,65, dunkel . . .	alle leben
6,81	" "	Wasser	4 †, 3 leben
6,81, dunkel	" "	" dunkel . .	alle leben

Es ergibt sich, daß die bei kleinerem p_H als 6,8 belichteten Tiere bei der Bestrahlung verhältnismäßig wenig oder gar nicht geschädigt werden, daß bei diesem p_H alle Kaulquappen am Leben bleiben, während bei alkalischer Reaktion p_H 7,15 und p_H 7,65 der größte Teil der Tiere,

und zwar steigend mit höherem p_H zugrunde geht. Nach einem anderen Versuch liegt die Grenze bereits bei ungefähr 6. Da es sich ja hier wohl um eine kombinierte Wirkung handelt, erscheint die Reaktion nicht absolut scharf, sie zeigt aber deutlich, daß eine erhebliche Abhängigkeit besteht, und zwar macht es den Eindruck, daß bei einer gewissen Entfernung vom isoelektrischen Punkt, den man vielleicht zu ungefähr 5 bis 6 annehmen darf, infolge der Dispersitätsverkleinerung die Tiere der Strahlenwirkung zugänglicher geworden sind. Die höhere Empfindlichkeit bei zunehmendem p_H zeigt sich auch beim Einbringen in reine Säurelösungen, worauf an dieser Stelle nicht eingegangen werden soll, weil hier noch andere Dinge eine Rolle spielen. Es möge aber schon erwähnt werden, daß auch bei Essigsäure und Propionsäure die Dinge grundsätzlich ebenso liegen, desgleichen auch bei Einbringen in Salzsäurelösungen; überall schützt eine höhere Acidität in gewissem Grade gegen die Lichtwirkung.

Als Resultat sämtlicher geschilderten Versuche scheint sich zu ergeben, daß auch bei der Wirkung des Lichtes auf tierische Organismen die Dispersität, zunächst wohl der aufnehmenden Haut, maßgebend ist für den tödlichen Erfolg der Strahlung, daß Dispersitätsvergröberung schützt, daß Dispersitätsverminderung, die sich hier im wesentlichen als Quellung dokumentiert, die Empfänglichkeit steigert. So bilden die Versuche am lebenden Organismus eine Parallele zu meinen Ergebnissen über die Einwirkung der Strahlung auf die Fermente. Daß auch beim lebenden Organismus eine Beeinflussung der Fermente eine wesentliche Rolle spielt, ist wahrscheinlich; diese Frage wird weiter verfolgt werden.

Anhangsweise sollen einige Versuche mitgeteilt werden, welche über das Wachstum der Kaulquappen unter verschiedenfarbigem Lichte ausgeführt worden sind. Sie wurden so angelegt, daß gleiche Portionen Laich in weiße Schalen eingebracht wurden, welche mit farbigen Gläsern überdeckt waren, so, daß aber genügend Luft hinzutreten konnte. Die Schalen standen nebeneinander am hellen Fenster. Die angewandten Farben waren gelb, rot, grün, blau; eine Schale war mit einem weißen Rippenglas bedeckt, eine sechste durch untergelegtes schwarzes Papier möglichst gegen Licht geschützt, eine siebente blieb offen. Das Wasser wurde in gewissen Intervallen gewechselt; zwecks Fütterung der jungen Kaulquappen wurde genügend Piscidin in feinstem Pulver in genügender Menge zugefügt. In dem Versuch, der am 24. März begonnen, am 21. April abgeschlossen wurde, ergab sich am Ende kein deutlicher Unterschied in der Entwicklung der Temporariaquappen; nur zeigte sich eine Differenz in der Pigmentierung, die, wie zu erwarten, am geringsten bei den im Dunkeln gehaltenen Tieren war, am stärksten aber bei den unter blauem Glas aufgezogenen. In der ganzen

Zeit standen die Gefäße am Tageslicht, in gleicher Weise vom Lichte getroffen.

Gewisse Unterschiede jedoch zeigten sich während der Entwicklungsdauer. So erwiesen sich am 29. März die unter grünem und blauem Glas gehaltenen Eier schlechter entwickelt als die anderen, und am 3. April war besonders in der blauen Probe noch verhältnismäßig viel unentwickelter Laich, eine schlechte Entwicklung auch bei der unbedeckten Probe, die auch noch am 6. April sehr deutlich zu erkennen war. Am selben Tage waren die größten Exemplare unter dem roten Glas festzustellen. Als Ergebnis dieser Versuche, die keinen Anspruch auf absolute Genauigkeit machen, möchte ich also feststellen, daß im Anfang kurzwelligeres Licht, grün und blau, die Entwicklung zu hemmen, rotes sie dagegen zu steigern scheint. Diese Differenzen gleichen sich aber in der Folge vollständig aus. Daß die geringere die Tiere treffende Strahlenenergie die anfänglichen Differenzen bedingt, scheint mir aus dem Grunde wenig wahrscheinlich, weil ja auch bei in offenstehendem Gefäß, welches also die gesamte Strahlung empfängt, zu gewisser Zeit eine Verzögerung der Entwicklung festzustellen ist.

Eine zweite Frage, die ich nur kurz streifen möchte, ist die, ob durch Jod die Entwicklung des Laichs gefördert wird. Bezüglich des Stoffwechsels des Kaninchens habe ich aus meinen Versuchen geschlossen, daß durch Jod, welches aus Jodalkali durch Bestrahlung in Freiheit gesetzt wird, ähnliche Wirkungen erzielt werden wie bei einer Hyperfunktion der Schilddrüse. Auf die Entwicklung der Kaulquappen wirkt nach meinen Versuchen durch Strahlung freigesetztes Jod nicht in gleicher Weise wie Schilddrüsenstoffe ein. Wurde Temporarialaich in Jodkalilösungen gesetzt und teils im Dunkeln, teils im Hellen gehalten, so zeigte sich nach den Angaben der

Tabelle XII.

Temporarialaich in offener Schale in 100 ccm Wasser am hellen Tageslicht (Anfang 25. März 1926).

	+ 5 ccm 5proz. JK-Lösung	+ 2 ccm 5proz. JK-Lösung	Ohne Zusatz
	Im Licht	Im Licht	Im Licht
29. III.	deutlich schlechter	schlechter	wenig schlechter als
2. IV.	bedeutend schlechter	„	„ „ „
15. IV.	Quappen kleiner	Quappen kleiner	kaum Untersch. gegen Dunkelkontrolle
22. IV.	schlechtere Entwicklung, kleiner als Dunkelkontrolle	schlechtere Entwicklung als Dunkelkontrolle	Kein Unterschied

Tabelle XII, freilich ohne Berücksichtigung des p_H — es wurden rein wässerige Lösungen verwendet —, daß nicht nur keine Be-

schleunigung der Entwicklung gegenüber den in einfachem Wasser gehaltenen Tieren eintrat, sondern daß besonders bei stärkeren JK-Konzentrationen die Entwicklung sogar gehemmt wurde und daß diese Hemmung sich auch am Ende des Versuchs nicht ausglich, wie es bei den Kontrollproben ohne Zusatz beobachtet wurde. Die Hemmung betrifft also nicht nur die Entwicklung der Quappen aus dem Laich, sondern auch die Weiterentwicklung der jungen Larven. Es ist demnach also nicht das Jod, welches für die der Schilddrüsensubstanz zugeschriebene Entwicklungsbeschleunigung der Temporarien verantwortlich ist.

Literatur.

1) *L. Pincussen*, Biologische Lichtwirkungen. Ergebn. d. Physiol. **19**. — 2) *Derselbe*, Fermente und Licht, VII. Diese Zeitschr. **152**, 406, 1924. — 3) *F. Seligsohn*, Katalase, I. Ebendaselbst **168**, 457, 1926. — 4) *R. Höber*, Chemie der Zelle und Gewebe, 5. Aufl., 1922, S. 589, 624, 674.

Untersuchungen über Cytolyse beim Krebs. I.

Von

N. Waterman und L. de Kromme.

(Aus dem Laboratorium des Anthoni van Leeuwenhoekhuis, Amsterdam.)

(Eingegangen am 27. Dezember 1926.)

Einleitung.

Im scharfen Gegensatz zu der modernen, vorwiegend ätiologischen Krebsforschung steht das Studium und vor allem auch die Erkenntnis der allgemeinen Vorrichtungen im Körper, die die Entwicklung eines malignen Tumors entweder fördern oder derselben vorbeugen.

Durch die ätiologische Forschung sind wenigstens einige präzise Daten ans Tageslicht gefördert worden, wenn wir auch deren Bedeutung und Auswirkung noch nicht zu übersehen vermögen. Die Carcinomgenese durch Teerpinselung ist eine Tatsache, wenn auch der Mechanismus unverstanden geblieben ist; dasselbe gilt für das Strahlencarcinom. So ist die Bedeutung des Sauerstoffmangels von *Warburg* dem Verständnis wesentlich nähergerückt worden.

Ganz anders ist es mit den Körperreaktionen bestellt. Es besteht doch sogar Streit, ob überhaupt beim Krebs Abwehrvorrichtungen existieren; deren Existenz wird von verschiedenen Forschern aufs heftigste bestritten; der Begriff der Disposition wird wohl allgemein anerkannt, aber es fehlen genaue Daten, woraus diese zu beurteilen sei.

Und doch würden aus der Erkenntnis dieser Disposition — eventuell Abwehr — Begriffe zu gewinnen sein, die auch das Krebsproblem in ätiologischer Hinsicht fördern könnten. Wenn man ergründen könnte, auf welchem Terrain diese Disposition bzw. Abwehr zu suchen sei, welche Mechanismen bei diesem Schutz in Tätigkeit gestellt würden, so könnten daraus auch für die Ätiologie und Pathogenese neue Erkenntnisse gewonnen werden.

Wenn wir z. B., auf unsere Untersuchungen vorausgreifend, der Meinung sind, daß die Prozesse von Zellzerfall (lysis) und Zellregeneration im normalen Körper zentral regulierte Vorgänge sind, zu denen unzweifelhaft mehrere lokale Faktoren hinzukommen, so konnte das

Wesen dieser Regulierung beim Krebs eine neue Beleuchtung erfahren und die Ätiologie mit Prozessen von Autolysis und Regeneration in Verbindung gebracht werden.

Wir müssen aber zu dem Gesagten sogleich eine Ausnahme machen und schon hier auf die von *Freund* und *Kaminer* einerseits und von *Neuberg* andererseits gefundenen fundamentalen Tatsachen aufmerksam machen.

Die hierher gehörigen Faktoren stehen schon seit 1912 da: Krebszellen werden von normalem Serum aufgelöst, von Serumtumorkranken dagegen nicht lysiert, sogar gegen Lysis von normalem Serum und Extrakten geschützt.

Diese Reaktion ist aber, außer von *Freund* und *Kaminer* selbst, so wenig gründlich durchforscht, es manifestieren sich dabei überdies so viele und wichtige Nebenfaktoren, daß eine Bearbeitung von Grund auf und in Verbindung mit den neuen Ergebnissen der experimentellen Krebsforschung ihre Berechtigung haben dürfte. Dazu kommt noch folgendes: Während *Neuberg* die Erscheinungen als atypische Fermentprozesse gewertet und sie mit den Fragen der allgemeinen Enzymchemie in Beziehung gesetzt hat, ist die cytolytische Reaktion von *Freund* und *Kaminer* hauptsächlich als diagnostische Reaktion gewürdigt worden, wozu sie unseres Erachtens nicht geeignet ist und auf welchem Gebiet ihre Bedeutung auch gar nicht liegt. Die Resultate in dieser Beziehung waren denn auch gar nicht ermunternd. Das ist auch nicht wunderzunehmen, denn die verschiedenen Tumorkranken sind untereinander so sehr verschieden, es kommen außerdem, vor allem bei weiter fortgeschrittenen Fällen, so viele Tumorprodukte in die Blutbahn — von Effekten von Fieber und Bestrahlung noch nicht zu reden —, daß eine positive Lysis unter diesen Umständen nicht verwundern kann. Hat es sich doch z. B. bei unseren Untersuchungen gezeigt, daß Punktionsflüssigkeiten von Tumorkranken, Tumorextrakte, immer lytische Faktoren enthalten. Auf der anderen Seite bestehen bei anderen Krankheiten ebenfalls Zellzerfall, vielleicht auch lysishemmende Faktoren.

Der Schluß muß leider lauten, daß die grundlegende Arbeit *Freund* und *Kaminers* durch die Betonung der diagnostischen Möglichkeit Schaden gelitten hat. Außerdem haben *Freund* und *Kaminer* selbst ihre Untersuchungen unter sehr speziellen Bedingungen und Fragestellungen fortgeführt und sind zu Auffassungen gelangt, die, wenn auch möglicherweise richtig, sich doch sehr von unseren pathogenetischen Krebsauffassungen entfernen.

Um die allgemeine Gültigkeit der cytolytischen Vorgänge beim Krebs besser in Verbindung mit der experimentellen Krebsforschung bringen zu können, haben wir uns teilweise von der Klinik mit ihrer verwirrenden Mannigfaltigkeit emanzipiert.

Die cytolytischen Vorgänge können sehr gut auch und mehr gleichmäßig bei den verschiedenen Tiertumoren studiert werden. Zugleich sind die experimentellen Möglichkeiten viel größer. Wir verfügen über die zahlreichen transplantablen Tumoren, außerdem über das Teercarcinom bei der Maus.

Wir haben nun die Absicht, die cytolytische Reaktion einer genauen Analyse zu unterwerfen. Dazu werden wir programmäßig verfahren und den Stoff in mehrere Teile gliedern müssen.

Wir fangen mit Material und Technik an.

I. Material und Technik.

Die krebszellenlösende Kraft einer Flüssigkeit (Blutserum, Exsudat, Organextrakt) wird nach der von *Freund* und *Kaminer* schon angegebenen Zählmethode bestimmt, d. h. in der Zählkammer wird die Anzahl von Zellen in einer Suspension vor und nach der Einwirkung der betreffenden Flüssigkeit bestimmt.

Die ganze Methode steht und fällt aber mit der Bereitung einer geeigneten Suspension. Nicht nur daß die Tumorzellen in möglichst vitalem Zustand verkehren sollen, keine Degenerationen (Verfettungen) aufweisen usw., auch ihre Fähigkeit zur Suspensierung ist von ausschlaggebender Bedeutung. Die Genauigkeit der Zählung ist, wie in dem nächsten Abschnitt auseinandergesetzt wird, hochgradig von der guten Verteilbarkeit abhängig.

Es ist kein Wunder, daß auf diese Weise das gewöhnlich angebotene menschliche Material (Operation, Sektion) vielfach diesen Anforderungen nicht genügt. Die besten Erfahrungen haben wir mit Mammacarcinomen, bisweilen auch mit Magen- und Rektumcarcinomen gehabt. Lymphdrüsenmaterial zeigte sich nur in ganz wenigen Fällen geeignet.

Wenn das Material gut ist, ist übrigens die Bereitung der Suspension nicht schwer. In der von *Freund* und *Kaminer* angegebenen Weise wird der Tumor zerkleinert, durch Gaze filtriert und wiederholt in der Zentrifuge mit *Freund*scher Lösung (0,6proz. NaCl + 1proz. saures, phosphorsaures Natron, $p_H = 5{,}4$) gewaschen.

Die Zahl der Zellen und ihre Isolierung werden mikroskopisch festgestellt und gegebenenfalls geeignete Verdünnungen gemacht.

Wenn das Material gut ist, kann es mehrere Tage in steriler Lösung aufbewahrt werden. Das Verhältnis zwischen Suspension und lytischer Flüssigkeit ist gewöhnlich 1 : 10.

Die absolute Zahl der Zellen ist innerhalb gewisser Grenzen für den Versuch ohne Bedeutung.

Weil auch das experimentelle Teercarcinom in unsere Untersuchungen einbezogen wurde, war es erwünscht, zu jeder Zeit über einen frischen Tumor ohne Nekrosen und mit genügender Suspendierfähigkeit verfügen zu können. Das geeignete Zellmaterial fanden wir dazu in einem transplantablen Carcinom, das sogenannte Twort Ca. vom Imp. C. I., ein langsam wachsender Tumor. Auch hier kann man öfters Enttäuschungen erleben, insofern, als auch selbst junge Tumoren nekrotisch sind und wenig isolierbare Zellen enthalten. Beim Carcinom Nr. 63 und sogar beim Rattencarcinom machten wir keine guten Erfahrungen. Auch das eigentliche Teercarcinom ist meistens ungeeignet.

Noch einiges über die Zellen. Sie sind meistens von beigemischten Lymphocyten leicht, schon durch ihre Größe, zu unterscheiden. Blutzellen werden schon bei der Zentrifugierung leicht von den Tumorzellen getrennt.

Die Suspension bleibt in der angegebenen Pufferflüssigkeit mehrere Tage haltbar. Die Zellen bleiben gut erkennbar; die Kernstrukturen bleiben sichtbar. Bisweilen konnten schöne mitotische Bilder beobachtet werden.



Aus den betreffenden Tabellen kann man denn auch mehrfach eine nicht unbedeutende prozentische Vermehrung herauslesen; bei gewissen jungen Tumoren in bisweilen fast unglaublichem Grade.

In den meisten, vornehmlich ersten Versuchen wurde in Übereinstimmung mit den *Freund* und *Kaminer*schen Versuchen Fluornatrium als Antisepticum hinzugefügt. Bei sterilem Arbeiten aber, wie es das experimentelle Material gestattet, ist die Zufügung von Fluornatrium nicht unbedingt nötig. Außerdem führt die Substanz, weil sie hemmend auf alle Fermentationen wirkt, Komplikationen herbei. An einem Beispiel wird später die Bedeutung dieser fermenthemmenden Wirkung erläutert werden.

Die Mischung: Flüssigkeit — Suspension wird in dickwandigen kleinen, mit sterilen Gummistöpseln verschlossenen Eprouvetten mehrere Minuten mit Hilfe einer kleinen Glasperle geschüttelt.

Die Mischung wird mit einer Glaspipette zur Zählung in eine *Bürker*sche Kammer gebracht.

Rechtfertigung der angewandten Technik.

Es erhebt sich unmittelbar die Frage, ob die angewandte Technik zuverlässig und vor allem empfindlich genug sei, um das lytische Phänomen, auch wenn es nur in geringerem Umfang auftritt, genau zahlenmäßig zu verfolgen. Es wird sich nämlich als unseres Erachtens sehr bedeutendes Ergebnis zeigen, daß die Lysis niemals 100proz. ist. Ob nun z. B. eine 10proz. Lysis Bedeutung hat, wird ganz von der Empfindlichkeit der Methode abhängen.

Die Methode ist darum auf Grund der Wahrscheinlichkeitsrechnung einer mathematischen Analyse unterworfen worden.

II. Mathematische Analyse.

Weil unsere Schlußfolgerungen sich auf Zählungen in der Zählkammer basieren, ist es notwendig, zuerst die Methodik dieser Zählungen einer kritischen Prüfung zu unterwerfen, zwecks Feststellung, ob diese nicht allzu großen Ungenauigkeiten ausgesetzt ist, und innerhalb welcher Grenzen sie zuverlässig ist.

Die erste Bedingung, welche man stellen muß, ist die einer *gleichmäßigen* Verteilung, die von sehr vielen Umständen: spezifischem und absolutem Gewicht der Zellen, Viskosität des Suspensionsmittels usw., beherrscht wird.

Die zweite Bedingung ist, daß bei den verschiedenen Manipulationen (Aussaugen der Flüssigkeit, Ausfließen aus der Pipette und kapillare Füllung der Zählkammer) eine regelmäßige Verteilung erhalten bleibt.

Die dritte Bedingung ist, daß bei diesen Manipulationen die Konzentration der Zellen in der Zählkammer derjenigen in der Eprouvette, welcher der untersuchte Tropfen entnommen ist, gleich ist.

An erster Stelle ist es notwendig, der verwandten Kapillarpipette Rechnung zu tragen. *Perrin* beschrieb den Einfluß, welcher von der Wand einer derartigen Pipette auf die gegenseitige Anziehung fester Teilchen und infolgedessen auf deren Verklebung ausgeübt wird; außerdem soll man bedenken, daß für das Aufsaugen eines Tropfens jedesmal eine neue Pipette zur Verwendung gelangt, so daß fortwährend mit Ausströmungsöffnungen

verschiedenen Kalibers gearbeitet wird. Auch diese Komplikation sollte in Rechnung gebracht werden müssen.

Es ist einleuchtend, daß für alle die beschriebenen mitwirkenden Faktoren keine allgemein gültigen, einfachen mathematischen Formeln zu geben sind.

Es ist darum auf Grund von empirisch erhaltenen Resultaten der Fehler berechnet worden und, unter Zuhilfenahme der Gesetze der Wahrscheinlichkeitsrechnung, die Wahrscheinlichkeit, daß der Fehler einer willkürlichen Zählung innerhalb einer bestimmten Fehlergrenze liegt, bestimmt worden.

Aus einem Diagramm der Zellverteilung in der Zählkammer würden theoretisch ohne allzuviel Schwierigkeiten Fehler und Wahrscheinlichkeit berechnet werden können. In diesem Falle umgeht man jedoch eben den Einfluß der Ungleichartigkeit der verschiedenen Pipetten, während man weiter bedenken soll, daß man nicht unterrichtet wird über die Verteilung der Zellen innerhalb jedes einzelnen Quadrants. Auf diese Weise würde eine viel kleinere Wahrscheinlichkeit gefunden werden.

Die Lehre der Wahrscheinlichkeitsrechnung lehrt, daß zur Fehlerbestimmung wenigstens zehn Wahrnehmungen nötig sind; diese Zahl genügt, vorausgesetzt, daß keine Auswahl stattfindet und die Wahrnehmungen einander in willkürlicher Reihe folgen.

Es muß deshalb in der Weise vorgegangen werden, daß eine Zellsuspension bereitet wird, worin die Zellen *so gut wie möglich verteilt werden*. Hieraus wird mit einer willkürlichen Pipette ein Tropfen in die Zählkammer gebracht und diese Zellen gezählt; diese Handlung (Suspendierung und Zählung) wird *zehnmal* wiederholt. Das Kriterium, das an eine reine richtige Verteilung gestellt werden muß, ist dieses, daß in der Kammer kein einziges Klümpchen wahrgenommen wird; ist diese Bedingung erfüllt, dann wird die Verteilung vom Zufall beherrscht, richtiger von demjenigen Komplex von Faktoren, die wir nicht zu beeinflussen vermögen.

Das Resultat unserer Analyse vorwegnehmend, kann mitgeteilt werden, daß für eine Wahrnehmung der Fehler beträgt:

bei einer Wahrscheinlichkeit . . . . . 0,5 = 4 Proz.
" " " . . . . . 0,9 = 11 "
" " " . . . . . 0,99 = 17 "

Zahl	Abweichung	Abweichung quadratiert
467	+ 15	225
436	— 16	256
451	— 1	1
463	+ 11	121
456	+ 4	16
452	0	0
453	+ 1	1
456	+ 4	16
438	— 14	196
448	— 4	16
4520	0	848

Mittelwert: 452,0

Der *Gauß*sche mittlere Fehler ist: $\sqrt{\frac{[\varepsilon\,\varepsilon]}{n}} = \mu$.

$$\mu = \sqrt{84{,}8} = 9{,}2,$$
$$r = 0{,}67449\,\mu = 6{,}2.$$

Berechnen wir jetzt die anderen Wahrscheinlichkeiten:

$$\text{Das Präzisionsmaß} = h = \frac{1}{\mu\sqrt{2}}.$$
$$h = \frac{1}{\sqrt{169{,}6}} = \frac{1}{13} = 0{,}0769.$$

Wenn man annimmt, daß die Abweichungen dem normalen Fehlergesetz folgen, so ist die Wahrscheinlichkeit, daß eine Abweichung höchstens $\pm\,\delta$ beträgt, bei einem Präzisionsmaß h

$$P = \frac{h}{\sqrt{\pi}} \int_{a-\delta}^{a+\delta} e^{-h^2(x-a)^2}\,dx = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^{h\delta} e^{-t^2}\,dt = \Phi(h\,\delta),$$

wenn $\Phi(x)$ die Funktion $\frac{2}{\sqrt{\pi}}\int_0^x e^{-t^2}\,dt$ darstellt, welche numerisch gegeben ist[1]).

Also ist für eine Wahrscheinlichkeit 0,5

$$\Phi(x) = \Phi(0{,}0769\,.\,\delta) = 0{,}5,$$

also

$$x = 0{,}0769\,.\,\delta = 0{,}477,$$
$$\delta = \frac{0{,}477}{0{,}0769} = 6{,}2,$$

und für eine Wahrscheinlichkeit 0,9 bzw. 0,99 15,1 bzw. 23,8. Ist μ_1 der mittlere Fehler einer Wahrnehmung, dann ist diese für das Mittel von n Wahrnehmungen μ_n.

$\mu_n = \frac{\mu_1}{\sqrt{n}}$, hier $n = 10$, also $W = 0{,}5$ . . . . $F = 19{,}6$,

$W = 0{,}9$ . . . . $F = 47{,}7$,

$W = 0{,}99$ . . . . $F = 75{,}2$,

d. h. bzw. 4, 11, 17 Proz.

III. Ergebnisse.

Aus den Tabellen I bis IV geht in einer Anzahl von Fällen die Richtigkeit des Grundprinzips hervor. Die Sera *inkomplizierter* Tumorfälle (d. h. wenn keine größeren Metastasierungen, Abszedierungen, ausgiebigen Strahlungseffekte vorhanden sind) lösen, im Gegensatz zu Gesunden, Krebszellen nicht auf. Das gilt, was unseres Erachtens noch nie zuvor untersucht worden ist, ebenfalls für das Serum von Mäusen mit *Spontan*tumoren. Auch Tiere mit autochthonem, doch

[1]) *Czuber*, Wahrscheinlichkeitsrechnung I.

experimentell entstandenem Carcinom haben ihre lytische Fähigkeit eingebüßt.

An der geteerten Mäusehaut können wir den Verlust der Lysierbarkeit sehr genau verfolgen; wir reservieren aber diese Untersuchungen für ein besonderes Kapitel.

Bei Tumorkranken, die bestrahlt werden oder die Abszedierungen zeigen, kann ein beträchtliches lysierendes Vermögen anwesend sein. Wir haben mehrmals Sera dieser Patienten, auch Punktionsflüssigkeiten untersucht; ohne Ausnahme lysieren sie. Das stimmt mit dem Verhalten von Tumorautolysaten überein. Man sollte eigentlich erwarten, daß diese, den Angaben *Freund* und *Kaminers* über zellschützende Fähigkeit gemäß, den lytischen Faktor neutralisieren sollten. Das ist aber keineswegs der Fall. Einige Andeutungen von einer antilytischen Kraft besitzen wir nur in einigen wenigen Experimenten, wo gut gewaschene Tumorzellensuspensionen während 24 Stunden der Autolysis überlassen werden. Die abzentrifugierte Flüssigkeit zeigte hier in der Tat antilytisches Vermögen. Wahrscheinlich ist dieser Körper nur in einem sehr beschränkten Stadium demonstrierbar. Er ist möglicherweise identisch mit dem tumorimplantationsfördernden Stoff, der von *Chambers* und *Scott* beschrieben wurde. Indessen sind wir bis jetzt noch nicht über die Bedingungen seines Entstehens und seiner Stabilität vollkommen orientiert.

Auch bei Gesunden ist das lytische Vermögen offenbar ein sehr wechselndes. Aus der Tabelle I geht hervor, daß gesunde Leute im kräftigen Lebensalter mehr oder weniger lysieren. Die von *Freund* und *Kaminer* festgestellte Tatsache des Sinkens dieses lytischen Vermögens im Alter erscheint uns recht plausibel, konnte aber nicht konsequent von uns untersucht werden.

Es ist ebenfalls wahrscheinlich, daß es auch bei Gesunden Schwankungen in dem Lysistiter gibt; wir haben z. B. vorzugsweise das Serum in nüchternem Zustand entnommen.

Beim Tiermaterial sind die Resultate viel einheitlichere. Indessen gibt es doch auch bei Mäusen und Ratten individuelle Differenzen.

Wie schon erwähnt, ist der lytische Prozeß niemals ganz vollständig. Wir betrachten diese Tatsache als eine sehr wichtige. Wäre die Lysis einfach die Folge einer chemischen Einwirkung, so könnte man, bei genügender Zeitdauer und genügender Konzentration, eine 100proz. Lysis erwarten, sogar wenn man ab origine eine verschiedene Widerstandsfähigkeit der Tumorzellen anwendet. Läßt man z. B. ein tryptisches Ferment auf eine solche Suspension einwirken, so sind innerhalb 24 Stunden *alle* Zellen aufgelöst.

Diese unvollständige Lysis ist dabei noch um so imponierender, weil oft schon sofort nach dem Einsetzen des Versuchs eine mikroskopisch wahrnehmbare Lysis einsetzt. Die Zellen verlieren ihre scharfe Kontur, bilden bisweilen eigentümliche protoplasmatische Ausstülpungen, und die Zellbestandteile werden weniger deutlich sichtbar. Es ist nicht einzusehen, daß dieser Prozeß wegen Verbrauchs des lysierenden Faktors bald sein Ende finden würde.

Erstens werden während der Lysis Produkte gebildet, welche das lytische Prinzip neutralisieren. Diese Möglichkeit zerfällt sogar noch in zwei begrifflich zu trennende Auffassungen; es könnten antagonistische Substanzen entstehen, die dem lytischen Prozeß die Wage hielten, oder aber die entstandenen Substanzen könnten den lytischen Faktor wirklich chemisch neutralisieren. Wir haben ziemlich viele Versuche angestellt, um die Existenz derartig schützender oder neutralisierender Faktoren nachzuweisen. Wir verfügen aber nur über sehr wenige Versuche, wo diese Wirkung einigermaßen in die Augen springend ist. Die Versuche in dieser Beziehung werden fortgesetzt.

Zweitens gibt es noch eine andere mögliche Erklärung, die ebenfalls vieles für sich hat; es bestehen schon von Anfang an individuelle Unterschiede zwischen den Zellen, welche von ihrem Alter, Stadium des mitotischen Prozesses, Stoffwechsel, abhängig sind.

Diese Auffassung kann in Einklang gebracht werden mit allen bisherigen therapeutischen Erfahrungen beim Carcinom (Strahlenbehandlung, Chemotherapie), welche gezeigt haben, daß es bei den Tumorzellen bedeutende Empfindlichkeitsunterschiede in den Zellen gibt. Die Schule *Regauds* vertritt sogar die Meinung, daß nur im Stadium der Zellindifferenz die Tumorzellen strahlenempfindlich sind.

Unsere Versuche würden dann so aufzufassen sein, daß die Zellen nur in bestimmten Lebensabschnitten für den lysierenden Faktor sensibilisiert sind.

Wir haben Versuche angestellt, um zwischen beiden Möglichkeiten zu entscheiden.

Tumorsuspensionen wurden der Lysis unterworfen; die Lysis quantitativ bestimmt, die übriggebliebenen Zellen durch Zentrifugieren von der Flüssigkeit getrennt und aufs neue der Lysis ausgesetzt.

Es wird gefunden, daß in der zweiten Lysisprobe auch wiederum nur ein Teil der Zellen lysiert wird. Man kann den Versuch zum dritten Male wiederholen: wieder ein Prozentsatz wird lysiert.

Es ergibt sich deshalb (weil hier der Einfluß autolytischer Produkte fortfällt), daß bei dieser fraktionierten Lysis Resistenzunterschiede

zwischen den Tumorzellen zutage treten (sei es, daß diese schon ab origine vorhanden, oder jetzt erworben sind) die, in Analogie auch mit dem, was von den roten Blutzellen bekannt ist, auf ihrem verschiedenen Alter bzw. Entwicklungsstadium beruhen dürften.

Unsere Versuche gestatten noch keine sichere Entscheidung.

Interessant in dieser Beziehung und ausschlaggebend ist der Einfluß von Stoffen, die als Antiseptica von *Freund* und *Kaminer* dem Versuch hinzugesetzt werden. Von uns wurde nämlich im größten Teile unserer Untersuchungen das Fluornatrium (1 Proz.) verwendet. Es zeigte sich nun, daß in den blinden Kontrollversuchen, wo keine oder nur unbedeutende Vermehrung der Tumorzellen stattfand, das Fluornatrium ziemlich indifferent war. Zeigte sich aber (z. B. wenn die Suspension aus Zellen ganz junger Tumoren bestand) eine lebhafte Vermehrung, so war auch das Fluornatrium stark wirksam. Man könnte schon aus diesen Versuchen einen eigentümlichen Konnex zwischen Fermentationen, die von Fluornatrium gehemmt werden, und Zellteilung ableiten.

IV. Quantitative Verhältnisse.

Der Grundversuch *Freund* und *Kaminers* besagt, daß die lysierende Flüssigkeit, einmal mit indifferenter Flüssigkeit verdünnt, auch noch wirksam ist, daß jedoch lytisches Serum, wenn mit nichtlösendem (schützendem) Ca-Serum vermischt, in seiner Wirksamkeit neutralisiert wird (Schutzreaktion).

Wir haben dieser Frage besonderes Interesse gewidmet, sowohl beim menschlichen als auch beim experimentellen Material. Es sei sogleich gesagt, daß sich beim menschlichen Tumorserum keine sichere Neutralisation hat nachweisen lassen. Die Frage erinnert mannigfach an die im vorigen Kapitel behandelte Schwierigkeit bei der unvollkommenen Lysierung.

Es wurden mit sicher nicht lysierendem, menschlichem Tumorserum Verdünnungsversuche angesetzt, wenn eine große Menge lysierendes Material (vorzugsweise Ätherextrakte aus Serum, Embryonen, Tumorautolysat nach Bestrahlung) vorhanden war. Die beiden Komponenten wurden in verschiedenen Verhältnissen miteinander vermischt und die resultierende Lysis bestimmt. Die Tabelle V gibt das Resultat solcher Versuche. Es zeigte sich, daß, wenn auch eine zweifelhafte Neutralisation besteht, der Schutz sich doch vom lytischen Faktor überneutralisieren läßt. Jedenfalls lassen diese Versuche den Schluß zu, daß bei therapeutischen Bestrebungen der Widerstand des tumorösen Materials sich beheben lassen könnte. Der Wichtigkeit der Frage wegen haben wir sie nochmals am experimentellen Material studiert.



V.

Die ätiologische Forschung hat uns im Teercarcinom der weißen Maus ein ziemlich leicht zu beschaffendes experimentelles Material gegeben, wo man das Entstehen eines unzweifelhaften Carcinoms von Etappe zu Etappe leicht verfolgen kann. Es erhebt sich dann gleich die Frage, wie es mit den lytischen und antilytischen Faktoren in den geteerten Häuten und schließlich in den carcinomatösen Häuten bestellt ist. Schon früher haben *Freund* und *Kaminer* bei diesem experimentellen Material ihre Reaktion studiert; leider haben sie die Haut von Ratten benutzt, bei denen, wie die Forschung ergeben hat, die Erzeugung eines Carcinoms durch Teerpinselung nur ausnahmsweise gelingt, im Gegensatz zu der Maus. Wohl ist die Rattenhaut im allgemeinen stärker lytisch wirksam als die Mäusehaut (was vielleicht eben mit dieser Disposition im Zusammenhang steht) und deshalb, auch wegen ihrer Größe, besser zum cytolytischen Versuch geeignet. Wir haben uns deshalb entschlossen, die Veränderungen der lytischen Faktoren an der Mäusehaut zu studieren und haben nur komplettierungsweise auch Rattenextrakte benutzt.

Herstellung der Extrakte.

Die kahle bzw. rasierte Haut wird unter Verwerfung carcinomatöser und papillomatöser Stellen im Mörser zerrieben, mit physiologischer NaCl-Lösung verdünnt, danach scharf zentrifugiert und schließlich durch *Kreuznach*-Keimfilter filtriert. Man bekommt dabei eine klare, gelbliche, sterile Flüssigkeit.

Es gelingt auch ziemlich leicht, Ätherextrakte einer derartigen Haut darzustellen: Die zerriebene Menge wird mehrfach mit Äther erschöpft; der Äther abgedünstet und das Residum in Kochsalzlösung aufgeschwemmt; die Fette durch kräftiges Zentrifugieren abgetrennt.

Untersucht man nun derartige Hautextrakte in verschiedenen Stadien der Teerpinselung, dann zeigt sich folgendes: Normale Mäusehäute haben ein recht wechselndes lytisches Vermögen, wie Tabelle II angibt. Es kommt sogar ab und zu ein Fall vor, wo das lytische Vermögen fehlt, ohne daß dafür eine bekannte Ursache anzugeben wäre. Jedenfalls spricht dieser Befund für die Annahme einer biochemischen Disposition, wie es *Freund* und *Kaminer* gewollt haben, und wie sie nur eigentlich *vor* dem Erscheinen eines Tumors studiert werden kann und soll.

Bei Rattenhautextrakten ist der Befund viel gleichmäßiger. Auch mit diesem Extrakt werden die deutlichsten lytischen Figuren beobachtet. Auch ist der lytische Prozentsatz bei Rattenhautextrakten und Rattenserum im Mittel höher als bei der Maus. Wir betrachten den lytischen Titer als den biochemischen Komponenten der Krebsimmunität.

Sehen wir jetzt, wie dieser Faktor sich unter Einfluß der Teerpinselungen ändert! Wie bekannt, treten bei regelmäßiger Pinselung

nach wenigstens 20maliger Behandlung die ersten Erscheinungen der Hautänderung ein (hypertrophisches-papillomatöses Stadium).

Erst nach langdauernder Fortsetzung der Teerpinselung offenbart sich in kürzerer oder längerer Zeit das Carcinom. Im folgenden geben wir nun getrennt die Resultate der Lysis im präcarcinösen und im carcinösen Stadium. Bei der Extrahierung sind die eigentlichen pathologischen Stellen, um Komplikationen zu vermeiden, sorgfältig abgetrennt worden.

Wie man sieht, ist im carcinösen Stadium die Lysis regelmäßig aufgehoben, im präcarcinösen Stadium sind die Resultate sehr variabel. Während sich wohl im allgemeinen eine Herabsetzung der lytischen Fähigkeit im Vergleich zu den normalen Werten zeigt (Tabelle VI), ist die Zahl der Versuche noch nicht groß genug, um eine direkte Beziehung zwischen Zahl der Pinselungen und Abnahme der lytischen Fähigkeit festzustellen. Obwohl also wohl sicher Teerpinselung diesen Faktor vernichtet, verstehen wir nicht recht die Resultate *Freund* und *Kaminers*, die bei Ratten schon nach wenigen Pinselungen Abnahme der lytischen Fähigkeit konstatieren, obwohl die Tiere nicht zur Carcinomentwicklung neigen.

Wir haben nun weiter untersucht, wie die Lysis verläuft, wenn durch Teerpinselung inaktivierte Hautextrakte mit lytischer Flüssigkeit in bestimmten Verhältnissen vermischt werden.

Die Tabelle V zeigt, daß auch beim experimentellen Carcinom nur in den wenigsten Fällen von einer eigentlichen Schutzreaktion die Rede ist; nur in drei Fällen: 92, 93 und 94, kann von einer Überneutralisierung gesprochen werden; in allen anderen ist die Cytolysis so verringert, als ob die lysierende Flüssigkeit mit indifferenter Flüssigkeit vermischt wäre. Jedenfalls besteht keine Regelmäßigkeit. Es geben also auch die experimentellen Untersuchungen keine sichere Entscheidung für die Annahme einer besonderen schützenden Substanz. Durch die nachfolgenden Bestrahlungsversuche wird vielleicht eine Erklärung des eigentlichen Wesens der Lysierungsmöglichkeit angebahnt.

Wir stellen also fest, daß, in Bestätigung der *Freund* und *Kaminer*schen Angaben, nach Teerpinselung die normale lytische Fähigkeit der Haut aufgehoben wird, wobei aber keine einfache Beziehung zwischen Anzahl der Pinselungen und Verlust dieser Fähigkeit besteht. Immer aber ist, wenn einmal das canceröse Stadium erreicht ist, die Lysis vollständig aufgehoben. Schützende Eigenschaften wurden aber nicht mit Sicherheit demonstriert. Das Bestehen solcher wird aber nicht geleugnet; in unseren Versuchen ist aber der Beweis nicht erbracht worden.

Wir gehen jetzt zu einem anderen Teile unserer Untersuchungen über, die an unserem Material die Frage beantworten sollen, wie lytische und antilytische Fähigkeiten sich unter Einfluß von Strahlungen verhalten. Man sieht zugleich die Wichtigkeit für die Therapie ein, weil gerade für das Hautcarcinom die heilende Wirkung der Strahlen außer Frage steht. Wir werden aber hier die Frage nur vom biochemischen Gesichtspunkt behandeln und klinische und therapeutische Gesichtspunkte außer acht lassen, weil diese mehr in einer klinischen Zeitschrift zu Hause sind.

Technisches.

Wir haben uns, weil leichter energetisch meßbar, hauptsächlich dem Studium der Röntgenstrahlen zugewandt.

Die Strahlen wurden nicht filtriert, um einen möglichst breiten Angriffspunkt zu haben; die bei der Strahlung entstehende Wärme, die nicht unbeträchtlich sein kann, wurde ebenfalls nicht eliminiert, weil dieser Faktor bei der klinischen Bestrahlung auch mit einbezogen wird.

Die Röntgenstrahlen wurden bei einer Energie von 180 kV, 2 Milliamp., erzeugt.

Man könnte nun wählen zwischen Bestrahlung des ganzen Versuchstieres und der Haut allein oder sogar des Hautextrakts, wie er schon früher bei den Teerpinselungen bereitet worden war.

Aber bei der Totalbestrahlung wird ein sehr kompliziertes System, wo man die Effekte nicht genau analysieren kann, der Strahlenwirkung ausgesetzt (vitale Reaktionen), bei der Bestrahlung der ganzen Haut entstehen technische Schwierigkeiten für die spätere Extraktion. Darum haben wir, vornehmlich der übersichtlichen Verhältnisse wegen, Bestrahlung in vitro angewandt.

Ein Extrakt verschiedener normaler präcarcinomatöser und carcinomatöser Häute wird in mehreren dickwandigen kleinen Eprouvetten gleichmäßig verteilt und kontinuierlich der Wirkung der Röntgenstrahlen ausgesetzt. Nach bestimmten Intervallen wird jeweils eine Eprouvette herausgenommen und in den Eisschrank gestellt. Wenn der Versuch, der bis zu 8 Stunden Bestrahlung durchgeführt wurde, beendet war, wurde eine Twortzellensuspension hergestellt und die lytische Kraft bestimmt.

Die Tabellen VII bis IX geben eine Übersicht dieser relativ sehr zahlreichen Versuche.

Es zeigt sich nun das interessante Ergebnis, daß:

1. Bei normalen Extrakten die Wirkung der Röntgenstrahlen nicht kontinuierlich in eine Richtung geht, sondern daß im Gegenteil das Resultat sehr diskontinuierlich ist. Nach relativ kürzerer Bestrahlung (z. B. 1 Stunde der angegebenen Energiemenge) zeigt sich eine Schwächung der Lysis, die nach weiterer Bestrahlung aber in eine Verstärkung (Aktivierung) umschlägt, um später wiederum einer Schwächung Platz zu machen. Öfter wird das Maximum der lytischen Fähigkeit in der fünften bis sechsten Stunde erreicht.



2. Umgekehrt steht es mit den Extrakten der präcancerösen und carcinomatösen Häuten, wo die lytische Fähigkeit verschwunden ist. Hier zeigt sich nämlich eine bedeutende Reaktivierung, die aber ebensowenig kontinuierlich ist wie bei den normalen Extrakten.

Wir betrachten dieses Resultat als eines unserer bedeutendsten. Es hat den Anschein, als ob durch Einführung bestimmter Energiequanten ein aktiver Körper in einen inaktiven Körper übergehen könnte und umgekehrt. Der Ausdruck „*Quanten*" ist hier vielleicht irreführend, denn wir haben bis jetzt keinerlei Anhaltspunkte in unseren Versuchen für die Annahme eines mathematischen faßbaren Konnex zwischen bestimmenden Energiequanten oder deren Multipla und lytischem Faktor.

Wir beabsichtigen im vorliegenden Teile unserer Untersuchungen keine nähere chemische Definierung der bei der Lysis wirksamen Kräfte, aber so viel kann doch gesagt werden, daß im Lichte der modernen Forschung es gar nicht unmöglich wäre, daß inaktive Stoffe durch Bestrahlung in aktive Form übergehen und umgekehrt. Nimmt man z. B. den von *Freund* und *Kaminer* als chemische Basis ihrer Ergebnisse dargestellten Strukturunterschied zwischen Bernsteinsäure und Fumarsäure einerseits, Fumarsäure und Maleinsäure andererseits, so wäre ein reversibler Übergang von Körpern derartiger Zusammensetzung ineinander unter Lichteinfluß gar nichts Undenkbares; die Bernsteinsäure ist doch eines der bekanntesten Stoffwechselprodukte und fungiert sehr leicht als Wasserstoffspender im Sinne *Wielands*.

Über die therapeutischen Konsequenzen dieser Versuche werden wir uns hier nicht äußern; sie liegen übrigens ziemlich offen zutage.

Das gilt um so mehr, weil die beschriebene Röntgenempfindlichkeit nicht nur eine Eigenschaft der erwähnten Hautextrakte, sondern allgemein gültig ist, auch für das *Serum*. Dadurch wird mehr als bisher die Aufmerksamkeit auf die Bedeutung der *indirekten* und nicht *direkten* zellulären Einwirkung der Strahlen gelenkt.

Es hat den Anschein, als ob wir in dem cytolytischen Versuch ein empfindliches Reagens hätten, das diese Änderungen augenfälliger zeigt, als dieses mit chemischen oder physikalisch-chemischen Methoden gelingt. Es entspricht übrigens wohl den modernen Auffassungen, die im Studium der photochemischen Reaktionen ein weites Arbeitsfeld erblicken.

VI.

Es ist wohlbekannt, daß man nicht lange nach der Entdeckung der Röntgenstrahlen ihren Einfluß auf Fermentationen untersucht

hat. Ebenso bekannt ist, daß diese fragliche Wirkung eigentlich nie über eine Kontroverse hinausgekommen ist.

Unsere Erfahrungen aber in bezug auf die Diskontinuität der Strahlenwirkung gaben uns eine Veranlassung, aufs neue unsere Aufmerksamkeit diesem Problem zuzuwenden.

Wir haben darum eine Reihe von Versuchen an einem relativ einfachen Fermentsystem gemacht, nämlich an der lipatischen Tributyrinspaltung in der stalagmometrischen Versuchsanordnung nach *Michaelis* und *Rona*. Als Lipase wurde das Pankreaspräparat nach *Rosenheim* benutzt. Es war ursprünglich die Absicht, vollkommen reine Pankreaslipase nach *Willstätter* zu benutzen, weil eigentlich nur unter diesen Umständen von einer Fermentbeeinflussung gesprochen werden könnte.

In allen anderen Fällen bleibt es vollkommen unklar, ob die gefundene Einwirkung das eigentliche Ferment oder den beigemischten Körper betrifft. Es ist das unseres Erachtens auch der Fall mit den von *Rona* beschriebenen Einwirkungen von Atoxyl, Chinin und Fluornatrium (die wir *nicht* vollständig haben bestätigen können).

Bis jetzt ist uns aber eine Reindarstellung nach *Willstätter* nicht gelungen, und darum beziehen sich unsere vorläufigen Versuche auf das *Rosenheim*sche Präparat.

Aus den beigefügten Tabellen (XII) einiger solcher Versuche mit Hautextrakten sieht man nun in der Tat eigentümliche Aktivitätsschwankungen im Zeitverlauf des esterifizierenden Vorgangs. Nach einer Periode erniedrigter Geschwindigkeit sieht man nach einer Röntgenbestrahlung von 4 bis 6 Stunden wiederum eine Beschleunigung, die nach ungefähr achtstündiger Bestrahlung wiederum einer Erniedrigung Platz macht.

Merkwürdigerweise koinzidieren diese eigentümlichen Schwankungen dieses Verlaufs im großen und ganzen mit den Ergebnissen des cytolytischen Versuchs. Es hat eben den Anschein, daß dieser cytolytische Versuch eine empfindliche Reaktion auf fermentative Aktivitätsschwankungen wäre, empfindlicher als jede chemische Reaktion. Es sind aber nicht genügende Gründe da, um auf eine Identität zwischen cytolytischer Reaktion und Fermentprozeß zu schließen, und wenn noch daran gedacht werden könnte, steht die Art des Ferments nicht fest; die Tributyrinspaltung ist nur als leicht verfolgbare Fermentwirkung gewählt worden.

In der nächsten Mitteilung hoffen wir auf die chemische Natur des untersuchten lytischen Faktors und auf das Wesen der cytolytischen Prozesse näher eingehen zu können.

Zusammenfassung.

Nach einer allgemeinen Einleitung werden Untersuchungen über die cytolytische Krebszellenreaktion mitgeteilt.

Der lytische Grundversuch von *Freund* und *Kaminer* sowie *Neuberg* wird bestätigt; die Ursache davon wird vor allem im Entstehen schützender Substanzen, wie auch in der individuell wechselnden Empfindlichkeit und dem Gebundensein dieser Empfindlichkeit an gewisse Stadien der Tumorzellentwicklung gesucht. Eine sichere Entscheidung ist noch nicht möglich. Im Zusammenhang hiermit bleibt die Beurteilung der *Freund* und *Kaminer*schen Angaben betreffs einer spezifischen Schutzsubstanz in unseren Versuchen noch offen, vor allem auch, weil die Strahlenexperimente auf eine mögliche Umwandlung von lytischem Stoff in unwirksame Substanz hinweisen.

Die Frage ist nämlich auch beim experimentellen Carcinom geprüft worden. Teerpinselung unterworfene Tierhäute zeigen in der Tat Verringerung ihres lytischen Vermögens; Häute im carcinomatösen Stadium lassen die lytische Fähigkeit vollkommen vermissen.

Auch im Tierversuch ist eine vollkommene Analyse des Versuchs und Feststellen einer bestimmten schützenden Substanz nicht gelungen. Ergebnisse, die in diese Richtung hinweisen könnten, sind auch einer anderen Deutung zugänglich.

Der Einfluß von Strahlen auf den lytischen Faktor ist evident; auch in Versuchen in vitro. Im allgemeinen zeigt sich, daß die Wirkung der Strahlen diskontinuierlich ist, insoweit, als die Lysis im zeitlichen Verlauf der Strahlung zuerst abschwächt, dann bedeutend verstärkt, schließlich wieder herabgesetzt wird. In Gegensatz dazu wird durch Teerpinselung inaktivierter Hautextrakt unter Einfluß von Bestrahlung wieder lytisch wirksam. Die Bedeutung dieses Phänomens für die Therapie liegt auf der Hand.

Es bestehen Analogien zwischen diesem Prozeß der Aktivierung und Inaktivierung und der Beeinflussung einer Fermentwirkung. Vielleicht können diese Versuche die Kontroverse über Möglichkeit von Beeinflussung von Fermenten durch Bestrahlung beheben, indem auf das wechselnde Resultat bei verschiedener Zufuhr von Energiequanten die Aufmerksamkeit gelenkt wird.

Es werden neue Versuche in Aussicht gestellt.

Literatur.

E. Freund und *Kaminer*, Biochemische Grundlagen der Carcinomdisposition, Springer 1925. — *P. Rona* und *Pavlović*, diese Zeitschr. **130**, 225, 1922, H. 1/4; *P. Rona* und *Takata*, ebendaselbst **134**, 108, 1922, H. 1/4. — *H. Chambers* und *Scott*, Brit. Journ. of exper. Pathology **4**/**5**, 1923/24. — *C. Neuberg*, diese Zeitschr. **26**, 344, 1910.



Tabelle I. Der lytische Grundversuch.

Nr.	Material	Prozent. Abnahme der Ca.-Zellen im Versuch	Prozent. Abnahme der Ca.-Zellen in der Kontrolle	Lytisches Vermögen Proz.
1	Normales Mäuseserum	62	4	58
3		38	— 5	43
31		34	2	32
43		25	—23	48
50		34	—12	46
58		41	— 9	50
71		13	11	2
91		64	20	44
40	Serum von Maus mit Spontancarcinom	—2	2	—4
59		—9	— 9	0
21	Normales Rattenserum	45	— 2	47
27		13	—24	37
48		37	—20	57
113		31	3	28
149		14	3	11
a	Normales Menschenserum	32	12	20
b		40	— 6	46
c		66	12	54
d		46	30	16
e		35	— 8	43

Tabelle II. Lytisches Vermögen normaler Mäusehäute.

Nr.	Prozent. Abnahme der Ca.-Zellen im Versuch	Prozent. Abnahme der Ca.-Zellen in der Kontrolle	Abnahme in relativen Zahlen im Versuch	Abnahme in relativen Zahlen in der Kontrolle	Lytisches Vermögen Proz.
5	59	5	207— 85	213—203	54
10	45	8	224—124	161—149	37
15	12	0	204—179	188—187	12
16	16	0	193—162	188—187	16
33	34	2	152—101	133—130	32
37	4	1	76— 73	89— 88	3
39	12	2	300—264	280—274	10
54	12	—12	256—225	279—312	24
56	—1	— 9	154—156	151—165	8
67	12	36	264—232	321—206	—24
76	50	21	266—134	136—107	29
119	36	— 2	321—204	239—243	38
136	7	—13	215—199	128—145	20
				Mittel:	20



Tabelle III.

Lytisches Vermögen carcinomatöser Mäusehäute.

Nr.	Prozent. Abnahme der Ca.-Zellen		Abnahme in relativen Zahlen		Lytisches Vermögen Proz.
	im Versuch	in der Kontrolle	im Versuch	in der Kontrolle	
6	— 6	5	193—204	213—203	— 11
7	— 2	5	219—223	213—203	— 7
12	•2	8	186—182	161—149	— 6
17	— 3	1	186—191	188—187	— 4
				Mittel:	— 7

Der Extrakt ist aus der ganzen Haut, mit Ausnahme der pathologischen Stellen, hergestellt.

Tabelle IV.

Menschliches Material.

Nr.	Material	Prozent. Abnahme der Ca.-Zellen		Lytisches Vermögen Proz.
		im Versuch	in der Kontrolle	
	Unkomplizierte Fälle.			
a	Serum Ca.-Mammae	— 4	42	— 46
b	Serum Ca.-Faciei	2	— 8	10
c	Serum Lupus-Ca.	0	— 12	— 12
d	Serum Ca.-Oesoph.	6	— 4	10
e	Serum Ca.-Laryngis	7	— 11	18
f	„ „	— 10	22	— 32
			Mittel:	— 8,5

Sera und Punktionsflüssigkeiten bei Patienten mit starker Metastasierung, Röntgeneinwirkung, Fieber, Abszessen.

Nr.	Material	Prozent. Abnahme der Ca.-Zellen		Lytisches Vermögen Proz.
		im Versuch	in der Kontrolle	
N.	Norm. Serum; Metastasierung (Pb-Einspritzung)	37	— 11	48
	Dasselbe	69	— 11	80
B.	Starke Tumoreinschmelzung nach Bestrahlung	51	— 22	73
L.	Serum von Ca.-Mammae; eingetretene Pneumonie	29	2	27
B.	Ca.-Oris; unter Radiumeinwirkung entstandene Punktionsflüssigkeit	38	12	71

Tabelle V.

Neutralisations- und Schutzversuch[1]).

Nr.	Mischungszahl	Prozent. Abnahme der Ca.-Zellen		Lytisches Vermögen im Schutzversuch Proz.
		Karzinomat. Flüssigkeit	Lysierende Flüssigkeit, normale Haut oder Serum	
8	Normale Haut + Ca.-Haut 1 : 1	— 2	54	— 11
13	Normale Haut + Ca.-Haut 1 : 1	— 3	47	— 6
18	Normale Haut + Ca.-Haut 1 : 1	— 9	16	— 32
44	Normales Serum + Teerhaut 1 : 2	— 41	48	—
61	Normale Haut + „ 1 : 1	— 1	— 16	— 48
72	Normales Serum + „ 3 : 1	3	2	— 13
92	„ „ + „ 1 : 1	25	44	22
93	Normale Haut + „ 1 : 1	— 10	— 9	19
94	„ „ + „ 1 : 1	— 4	— 9	31
32	Normales Serum + „ 1 : 2	81	32	—
A. 1	Normales Serum (Mensch)	—	34	—
2	Serum Ca.-Mammae	10	—	—
3	Norm. Serum + Ca.-Serum 3 : 1	—	—	17
4	Dasselbe 1 : 3	—	—	16
B. 1	Ätherextrakt von Kalbserum	—	61	—
2	+ *Freunds* Flüssigkeit 3 : 1	—	—	54
3	Dasselbe 2 : 2	—	—	37
4	„ 1 : 3	—	—	52
C. 1	Ätherextrakt von Embryonen	—	35	—
2	Dasselbe, verdünnt mit *Freunds* Flüssigkeit 1 : 1	—	24	21
D. 1	Carcinomserum	18	—	—
2	Ätherextrakt von Kalbserum	—	54	—
3	Extrakt + Serum 3 : 1	—	—	32
4	Dasselbe 1 : 3	—	—	11
E. 1	Unter Radiumeinfluß erweichter Tumor (Flüssigkeit)	—	50	—
2	Carcinomatöses Serum	— 32	—	—
3	Lytische Flüssigkeit + Ca.-Serum 3 : 1	—	—	18
4	Dasselbe 1 : 3	—	—	48

[1]) In diesen Zahlen sind der Raumersparnis wegen die Kontrollzahlen bereits verarbeitet worden.

Tabelle VI.

Beziehung zwischen Zahl der Pinselungen und lytischem Vermögen der geteerten Mäusehäute.

Nr.	Prozent. Abnahme der Ca.-Zellen		Abnahme in relativen Zahlen		Zahl der Pinselungen	Lytisches Vermögen Proz.
	im Versuch	in der Kontrolle	im Versuch	i. d. Kontrolle		
35	16	2	95—80	133—130	30	14
41	3	2	180—175	280—274	15	1
62	—12	36	305—342	321—206	20	—48
73	—2	11	119—121	148—132	10	—13
79	43	21	180—103	136—107	40	22
85	39	20	174—106	122—97	15	19
96	23	4	161—124	140—135	15	19
97	35	4	165—108	140—135	15	31
121	—12	—2	208—232	239—243	20	—10
128	35	—7	303—198	106—113	20	42
133	—12	0	102—114	90—90	40	—12
137	8	—13	282—259	128—145	25	21
						Mittel: 7

Tabelle VII.

Einfluß der Röntgenbestrahlung verschiedener Zeitdauer auf das cytolytische Vermögen von normalen Häuten (Maus).

Nr.	Bestrahlungsdauer Stunden	Prozentische Abnahme der Ca.-Zellen		Abnahme in relativen Zahlen		Lytisches Vermögen Proz.
		im Versuch	in der Kontrolle	im Versuch	in der Kontrolle	
36—38	0	4	1	76—73	89—88	3
	$4^1/_2$	35	1	91—59	89—88	34
53—55	0	12	—12	256—225	279—312	24
	$4^1/_2$	49	—12	244—125	279—312	61
56—60	0	—1	9	154—156	151—165	—10
	2	8	9	139—128	151—165	—1
76—78	0	50	21	266—134	136—107	29
	4	56	21	194—86	136—107	35
	5	62	21	239—91	136—107	41
95—105—108	0	—5	4	101—106	140—135	—9
	$4^1/_2$	39	25	102—62	102—76	14
	$5^1/_2$	38	25	95—59	102—76	13
	$6^1/_2$	20	25	46—37	102—76	—5

Tabelle VIII.

Einfluß der Röntgenstrahlen auf die lytische Wirksamkeit von Rattenhaut.

Nr.	Bestrahlungsdauer Stunden	Prozentische Abnahme der Ca.-Zellen		Abnahme in relativen Zahlen		Lytisches Vermögen Proz.
		im Versuch	in der Kontrolle	im Versuch	in der Kontrolle	
24–26	0	8	—24	156—144	147—183	32
	4½	17	—24	144—119	147—183	41
	5½	24	—24	116—88	147—183	48
46–47	0	9	—20	113—103	125—150	29
	2½	19	—20	146—118	125—150	39
110–112	0	31	3	162—111	140—136	28
	2½	42	3	153—88	140—136	39
	4	6	3	97—91	140—136	3
121	0	—12	—2	208—232	239—243	—10
	4½	32	—2	264—179	239—243	34
	6	30	—2	308—217	239—243	32
	7½	42	—2	338—196	239—243	44
	9	33	—2	246—166	239—243	35
	10½	51	—2	333—164	239—243	53
137	0	8	—13	282—259	128—145	21
	4½	—4	—13	253—262	128—145	9
	5½	9	—13	307—279	128—145	22
	6½	31	—13	280—194	128—145	44
	7½	59	—13	193—80	128—145	72
128	0	35	—7	303—198	106—113	42
	4½	45	—7	301—167	106—113	52
	6	15	—7	242—206	106—113	22

Tabelle IX.

Einfluß von Röntgenstrahlen auf Hautextrakte von normalen Ratten. Bereitung: 1 g Haut auf 1 ccm physiologischer NaCl-Lösung.

Nr.	Bestrahlungsdauer Stunden	Prozentische Abnahme der Ca.-Zellen		Abnahme in relativen Zahlen		Lytisches Vermögen Proz.
		im Versuch	in der Kontrolle	im Versuch	in der Kontrolle	
143–151	0	39	3	227—139	165—160	36
	3	20	3	193—154	165—160	17
	4	31	3	182—126	165—160	28
	5	—4	3	104—108	165—160	—7
	6	39	3	115—70	165—160	36



Tabelle X.

Einfluß von Röntgenstrahlen auf die cytolytische Wirksamkeit von Rattenserum.

Nr.	Bestrahlungsdauer Stunden	Prozentische Abnahme der Ca.-Zellen		Abnahme in relativen Zahlen		Lytisches Vermögen Proz.
		im Versuch	in der Kontrolle	im Versuch	in der Kontrolle	
27–30	0	13	— 24	154—134	147—183	37
	$4^1/_2$	18	— 24	180—147	147—183	42
	$5^1/_2$	11	— 24	184—164	147—183	35
113–116	0	31	3	169—117	140—136	28
	$2^1/_2$	27	3	146—106	140—136	24
	4	11	3	189—169	140—136	8
149–151	0	14	3	167—144	165—160	11
	6	31	3	148—102	165—160	28

Tabelle XI.

Einfluß von Röntgenstrahlen auf die cytolytische Fähigkeit von präcarcinomatösen Teerhäuten (Maus).

Nr.	Bestrahlungsdauer Stunden	Prozentische Abnahme der Ca.-Zellen		Abnahme in relativen Zahlen		Lytisches Vermögen Proz.
		im Versuch	in der Kontrolle	im Versuch	in der Kontrolle	
62	0	— 12	36	305—342	321—206	— 48
	$2^1/_2$	11	36	237—212	321—206	— 25
	$3^1/_2$	20	36	202—161	321—206	— 16
	$4^1/_2$	22	36	215—167	321—206	— 14
	$5^1/_2$	39	36	236—144	321—206	3
73	0	— 2	11	191—121	148—132	— 13
	5	32	11	170—115	148—132	21
79	0	43	21	180—103	136—107	22
	4	53	21	213—100	136—107	32
	5	56	21	170— 74	136—107	35
	6	29	21	156—110	136—107	8
	7	56	21	197— 87	136—107	35
85	0	39	20	174—106	122— 97	19
	4	64	20	157— 56	122— 97	44
	6	50	20	202—102	122— 97	30
	7	19	20	108— 88	122— 97	— 1
	8	34	20	228—150	122— 97	14
96	0	23	4	161—124	140—135	19
	5	7	4	152—142	140—135	3
	6	— 1	4	129—130	140—135	— 5
	7	29	4	126— 89	140—135	25
	8	42	4	197—114	140—135	38
97	0	35	4	165—108	140—135	31
	5	29	4	143—145	140—135	25
	$6^1/_2$	— 1	4	134— 94	140—135	— 5
	8	16	4	152—127	140—135	12

Tabelle XII.

Verlauf der Tributyrinspaltung (10 ccm) unter Einfluß von 0,2 ccm Extrakt der normalen Rattenhaut.

Extrakt	Tropfenzahl nach				
	0 Stdn.	1 Std.	2 Stdn.	3 Stdn.	6 Stdn.
Unbestrahlt	158	135	126	—	—
Bestrahlt $2^1/_2$ Stunden	159	130	122	—	—
„ $3^1/_2$ „	158	129	122	—	—
„ $4^1/_2$ „	158	128	122	—	—
„ $5^1/_2$ „	158	128	121	—	—
„ $6^1/_2$ „	159	129	122	—	—
„ $7^1/_2$ „	158	129	122	—	—
„ $8^1/_2$ „	158	130	123	—	—
Unbestrahlt	156	148	137	134	127
Bestrahlt $1^1/_2$ Stunden	156	150	141	136	128
„ 3 „	156	145	136	133	124
„ $4^1/_2$ „	156	142	134	130	122
„ 6 „	156	143	136	131	123
„ $7^1/_2$ „	156	149	139	132	123

Die Wirkung des Milzextraktes auf die Farbstoffausscheidung aus dem Blute.

Von

G. Farkas und H. Tangl.

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Budapest.)

(Eingegangen am 27. Dezember 1926.)

Mit 5 Abbildungen im Text.

In einer vor kurzem in dieser Zeitschrift erschienenen Arbeit (*Farkas* und *Tangl*) wurde gezeigt, daß in die Blutbahn injizierter Farbstoff darin länger verweilt, wenn den Versuchstieren vorher die Milz entfernt wird. Dies findet seine Erklärung darin, daß die Oberfläche des Reticuloendothelialsystems mit der Entfernung der Milz verringert wird.

In der letzten Zeit erschienen mehrere Arbeiten, deren Zweck die Erforschung der Funktion der Milz war. So wird namentlich ganz besonders hervorgehoben, daß die Milz eine Vorratskammer der roten Blutkörperchen darstellt, in der die Blutkörperchen ruhend liegen, um im Bedarfsfall in die Blutbahn geworfen zu werden. Dies ergibt sich insbesondere aus den Arbeiten von *J. Barcroft* und *H. Barcroft* (1923), wonach es nach Einatmenlassen von CO-Gas ungefähr eine halbe Stunde dauert, bis sämtliche roten Blutkörperchen der Milz in die Blutbahn gelangen und mit dem Gas vermischt werden. Dagegen wird nach den Versuchen das in der Milz aufgespeicherte Blut bei lebhaften Körperbewegungen, sowie nach der Reizung des Nervus splanchnicus, die zu einer Kontraktur des Muskelapparats der Milz führt, sofort in die Blutbahn geworfen, so daß die Blutkörperchen allsogleich mit dem Gas in Berührung kommen.

Andere Arbeiten lehren hinwieder, daß die Milz nicht nur eine Vorratskammer der roten Blutkörperchen ist, sondern auch ein Hormon erzeugt. So hatte *Downs Ardrey W.* und *Nathan B. Eddy* (1920 und 1923) Tieren Milzextrakt subkutan verabreicht, worauf die Erythrocytenzahl abnahm. Insbesondere machte sich diese Wirkung geltend nach der Verabreichung einer Extraktmenge von 30 mg pro Kilogramm, wo die Abnahme der Erythrocytenzahl 31 Proz. betrug. Einige Tage nach der Injektion stellte sich eine Vermehrung der roten Blutkörperchen ein. Dies ist

als eine kompensatorische Wirkung aufzufassen, da der Milzextrakt auf das Knochenmark anregend wirkt, wodurch die Produktion der roten Blutkörperchen eine Steigerung erfährt. Da der Milzextrakt eiweißfrei war, darf die geschilderte Wirkung als spezifisch aufgefaßt werden. Die genannten Forscher sind der Auffassung, daß die Hormone der Milz die älteren und daher bereits weniger wiederstandsfähigen Erythrocyten zur Auflösung bringen und dadurch die Senkung der Erythrocytenzahl bedingen. Diese Auffassung wird bekräftigt durch den Umstand, daß sich dieselbe Wirkung der Milzextrakte auf rote Blutkörperchen auch in vitro nachweisen läßt, falls man dafür sorgt, daß beim Waschen der Blutkörperchen die älteren Exemplare nicht anheimfallen. Interessant ist es, daß neben dieser Verminderung der Zahl der roten Blutkörperchen jene der weißen bis um 41 Proz. anstieg.

A. Belák und *E. Sághi* (1924) zeigten, daß nach der intravenösen Einspritzung von Elektroferrol die Erythrocytenzahl zunahm, die verschiedenen roten Blutkörperchen an Hämoglobin dagegen arm waren. Bei entmilzten Tieren trat diese Wirkung nicht ein. Sie nahmen an, daß das Eisen die Milz angreift und diese den Reiz vielleicht durch ein Hormon dem Knochenmark übermittelt. *Elex Brinchmann* (1920) fütterte endlich Kaninchen und Meerschweinchen mit frischer Ochsenmilz und beobachtete hierauf eine Abnahme der Erythrocytenzahl. Bei täglicher Fütterung mit frischer Milz zeigten die Tiere der experimentell erzeugten Anämie weniger ausgesprochene Destruktion der roten Blutkörperchen und bekundeten auch einen besseren Allgemeinzustand als die Kontrolltiere.

Diese Ergebnisse, die gut mit den anderen bereits zitierten Befunden übereinstimmen, zeigen eigentlich, daß die Milzhormone durch die Verdauungssäfte nicht zerstört werden, sondern zur Resorption gelangen und ihre Wirkung auf dem Blutwege auszuüben vermögen. Diese Angaben veranlaßten uns, Versuche anzustellen zur Klärung der Frage, was für eine Wirkung die Milzextrakte auf die Ausscheidung von Farbstoffen aus der Blutbahn entfalten.

Methodik.

Zu den Versuchen verwendeten wir Hunde, denen wir intrakardial in einer 2proz. Lösung pro Kilogramm Körpergewicht 1 cg Trypanblau injizierten, einen Farbstoff, der nach den Mitteilungen von *Krebs* und *Wittgenstein* (1926) besonders lange im Blute verweilt. Nach der Injektion entnahmen wir direkt aus dem Herzen nach 5 und nach 30 Minuten, sowie nach 1, 4 und 7 Stunden Blut. Zur Verhinderung der Gerinnung versetzten wir das Blut mit einer Lösung von Natriumoxalat und zentrifugierten die Blutkörperchen ab. Die Konzentration des Farbstoffs im Serum wurde dann in dem Kolorimeter von *Autenrieth* bestimmt, wobei wir als Standardlösung eine 1 : 5000 Trypanblaulösung in Wasser benutzten, die außerdem noch ½ Proz. Gelatine enthielt. Aus den erhaltenen Werten wurde die

Konzentration des Farbstoffs unter Zuhilfenahme einer Eichungskurve berechnet.

In jeder Untersuchungsreihe wurden die Hunde zuerst unter normalen Verhältnissen untersucht, dann wurde ihnen die Milz entfernt und der Farbstoffausscheidungsversuch wiederholt. Dem folgte dann der dritte Versuch, wo die entmilzten Hunde Milzextrakt erhielten. Zwischen jedem Versuch wurde wenigstens 2 Wochen gewartet, währenddessen der in den Tieren verbliebene Farbstoff ganz ausgeschieden wurde. In einer Versuchsreihe wurde milzhaltigen Hunden Milzextrakt gegeben.

Zu den Versuchen hatten wir das Milzextrakt Lienis sec. Richter, Budapest, verwendet, das pro Kubikzentimeter 1 g frischer Milz entsprach.

Versuchsreihen.

Erster Versuch.

Hund. Männchen, 12 kg. Der erste Farbenausscheidungsversuch wurde am 13. September 1926 ausgeführt. Die Operation war am 16. September. Den weiteren Farbenausscheidungsversuch hatten wir am 2. Oktober ausgeführt. Am 30. Oktober gaben wir eine Lienisinjektion und eine Farbstoffinjektion und untersuchten die Farbstoffausscheidung. Im Versuch vor der Operation fanden wir

nach	5 Minuten	nach	der	Injektion	70	Proz.	der	eingeführten	Farbenmenge
,,	30 ,,	,,	,,	,,	65	,,	,,	,,	,,
,,	1 Stunde	,,	,,	,,	47	,,	,,	,,	,,
,,	4 Stunden	,,	,,	,,	26	,,	,,	,,	,,
,,	7 ,,	,,	,,	,,	16	,,	,,	,,	,,

Bei demselben Versuchstier nach der Operation

nach	5 Minuten	nach	der	Injektion	96	Proz.	der	eingeführten	Farbenmenge
,,	30 ,,	,,	,,	,,	81	,,	,,	,,	,,
,,	1 Stunde	,,	,,	,,	59	,,	,,	,,	,,
,,	4 Stunden	,,	,,	,,	52	,,	,,	,,	,,
,,	7 ,,	,,	,,	,,	37	,,	,,	,,	,,

Der dritte Versuch, wo wir auch Lienisextrakt gegeben hatten, brachte uns die folgenden Daten:

nach	5 Minuten	nach	der	Injektion	73	Proz.	der	eingeführten	Farbenmenge
,,	30 ,,	,,	,,	,,	69	,,	,,	,,	,,
,,	1 Stunde	,,	,,	,,	51	,,	,,	,,	,,
,,	4 Stunden	,,	,,	,,	28	,,	,,	,,	,,
,,	7 ,,	,,	,,	,,	18	,,	,,	,,	,,

Die erhaltenen Daten, wiedergegeben durch ein Graphikon, zeigen das Folgende:

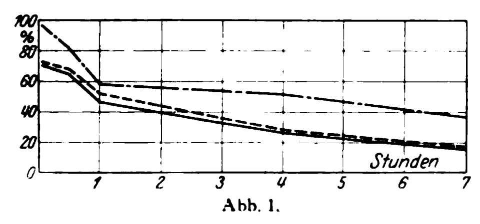


Abb. 1.

Zweiter Versuch.

Hund, Männchen, 8,5 kg. Erster Farbenausscheidungsversuch wurde am 15. September ausgeführt. Die Operation war am 21. Oktober 1926. Der zweite Farbenausscheidungsversuch wurde am 5. Oktober vollbracht. Der Dritte, bei welchem der Lienisextrakt auch verabreicht wurde, ist am 5. November ausgeführt worden. Im ersten Versuch gaben wir 4,5 ccm von der 2proz. Trypanblaulösung, im zweiten und dritten Versuch 4 ccm, da das Versuchstier durch die Operation 0,5 kg von seinem Gewicht verloren hat.

Im Versuch vor der Operation fanden wir

nach 5 Minuten nach der Injektion 58 Proz. der eingeführten Farbenmenge
„ 30 „ „ „ „ 50 „ „ „ „
„ 1 Stunde „ „ „ 45 „ „ „ „
„ 4 Stunden „ „ „ 26 „ „ „ „
„ 7 „ „ „ „ 18 „ „ „ „
„ 24 „ „ „ „ 8 „ „ „ „

Bei demselben Versuchstier nach der Operation:

nach 5 Minuten nach der Injektion 98 Proz. der eingeführten Farbenmenge
„ 30 „ „ „ „ 79 „ „ „ „
„ 1 Stunde „ „ „ 58 „ „ „ „
„ 4 Stunden „ „ „ 53 „ „ „ „
„ 7 „ „ „ „ 34 „ „ „ „

Der dritte Versuch, wo auch Lienisextrakt gegeben wurde, brachte uns die folgenden Daten:

nach 5 Minuten nach der Injektion 61 Proz. der eingeführten Farbenmenge
„ 30 „ „ „ „ 54 „ „ „ „
„ 1 Stunde „ „ „ 49 „ „ „ „
„ 4 Stunden „ „ „ 25 „ „ „ „
„ 7 „ „ „ „ 18 „ „ „ „
„ 24 „ „ „ „ 13 „ „ „ „

Die erhaltenen Daten, durch ein Graphikon anschaulicher gemacht, zeigen das Folgende:

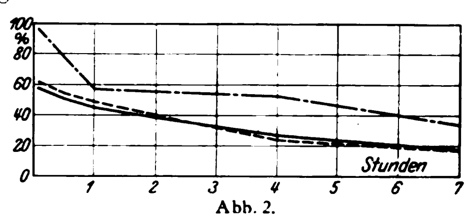


Abb. 2.

Dritter Versuch.

Hund, Männchen, 12 kg. Der erste Farbenausscheidungsversuch wurde am 26. September 1926 ausgeführt. Die Operation war am 30. September. Der zweite Farbenausscheidungsversuch war am 20. Oktober. Der dritte Versuch, bei welchem Lienisextrakt auch verabreicht wurde,

war am 8. November. Im ersten Versuch gaben wir 6 ccm von der 2proz. Trypanblaulösung.

Im Versuch vor der Operation fanden wir

nach	5 Minuten	nach der Injektion	53	Proz. der eingeführten Farbenmenge
„	30 „	„ „ „	48	„ „ „ „
„	1 Stunde	„ „ „	44	„ „ „ „
„	4 Stunden	„ „ „	29	„ „ „ „
„	7 „	„ „ „	18	„ „ „ „

Bei demselben Versuchstier nach der Injektion:

nach	5 Minuten	nach der Injektion	99	Proz. der eingeführten Farbenmenge
„	30 „	„ „ „	77	„ „ „ „
„	1 Stunde	„ „ „	56	„ „ „ „
„	4 Stunden	„ „ „	51	„ „ „ „
„	7 „	„ „ „	31	„ „ „ „

Der dritte Versuch, wo auch Lienextrakt verabreicht wurde, brachte uns die folgenden Daten:

nach	5 Minuten	nach der Injektion	59	Proz. der eingeführten Farbenmenge
„	30 „	„ „ „	49	„ „ „ „
„	1 Stunde	„ „ „	39	„ „ „ „
„	4 Stunden	„ „ „	30	„ „ „ „
„	7 „	„ „ „	25	„ „ „ „

Die erhaltenen Daten, anschaulich gemacht durch ein Graphikon, zeigen das Folgende:

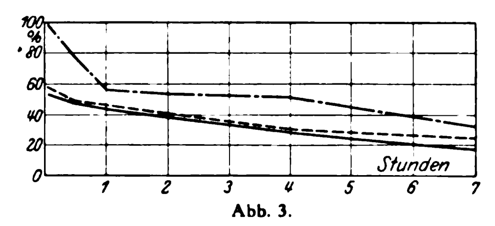


Abb. 3.

Vierter Versuch.

Hund, Männchen, 12 kg. Der erste Farbenausscheidungsversuch wurde am 1. November ausgeführt. Der zweite Ausscheidungsversuch war am 20. November. In diesem Versuch wurde dem Hunde 1 ccm Lienin gegeben. In beiden Versuchen wurden 6 ccm von der 2proz. Trypanblaulösung verabreicht.

Im ersten Versuch fanden wir:

nach	5 Minuten	nach der Injektion	68	Proz. der eingeführten Farbenmenge
„	30 „	„ „ „	58	„ „ „ „
„	1 Stunde	„ „ „	47	„ „ „ „
„	4 Stunden	„ „ „	30	„ „ „ „
„	7 „	„ „ „	20	„ „ „ „

Im zweiten Versuch, wo 1 ccm Lienextrakt verabreicht wurde, fanden wir:

nach	5 Minuten	nach	der	Injektion	77	Proz.	der	eingeführten	Farbenmenge
„	30 „	„	„	„	62	„	„	„	„
„	1 Stunde	„	„	„	46	„	„	„	„
„	4 Stunden	„	„	„	34	„	„	„	„
„	7 „	„	„	„	22	„	„	„	„

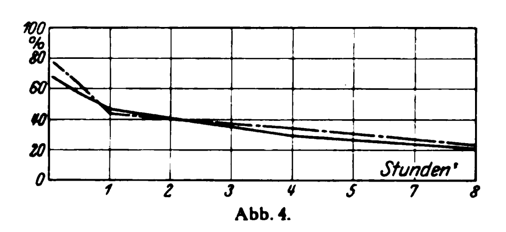


Abb. 4.

Fünfter Versuch.

Hund, Weibchen, 14 kg. Der erste Farbenausscheidungsversuch wurde am 5. September ausgeführt. Der zweite Ausscheidungsversuch war am 20. September, wo wir den Lienextrakt gaben. In jedem Versuch gab ich 7 ccm 2proz. Trypanblaulösung.

Im ersten Versuch fanden wir

nach	5 Minuten	nach	der	Injektion	69	Proz.	der	eingeführten	Farbenmenge
„	30 „	„	„	„	60	„	„	„	„
„	1 Stunde	„	„	„	49	„	„	„	„
„	4 Stunden	„	„	„	28	„	„	„	„
„	7 „	„	„	„	18	„	„	„	„

Im zweiten Versuch, wo wir 1 ccm Lienextrakt verabreicht hatten, fanden wir

nach	5 Minuten	nach	der	Injektion	77	Proz.	der	eingeführten	Farbenmenge
„	30 „	„	„	„	60	„	„	„	„
„	1 Stunde	„	„	„	51	„	„	„	„
„	4 Stunden	„	„	„	30	„	„	„	„
„	7 „	„	„	„	19	„	„	„	„

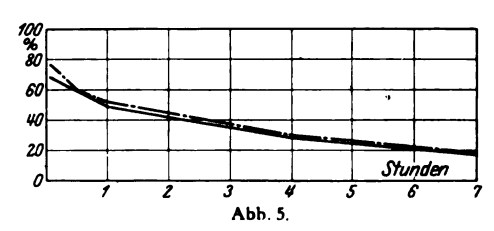


Abb. 5.

Wie aus den Tabellen ersichtlich ist, sind die gehegten Erwartungen in Erfüllung gegangen. Bei den Hunden, denen die Milz entfernt wurde, schied der Farbstoff viel langsamer aus dem Blute als bei den nicht entmilzten. Gab ich aber entmilzten Hunden Milzextrakt, so schied der Farb-

stoff fast gerade so schnell aus dem Blute, als ob die Hunde eine Milz hätten. Das weist darauf hin, daß die Milz im retikuloendothelialen System nicht nur zufolge ihrer farbstoffspeichernden Zellen eine Rolle spielt, sondern nebenbei auch ein Hormon entsendet, deren Wirkung darin besteht, daß der Farbstoff in viel kürzerer Zeit das Blut verläßt. Diese Wirkung kann eine direkte sein, kann aber vielleicht auch dadurch bedingt sein, daß es andere Organe reizt und diese zur Produktion von Stoffen anreizt, wodurch die Gefäßwände mehr durchgängig gemacht wurden und die Farbstoffspeicherung größer wird. Bei den nicht entmilzten Hunden übte der Milzextrakt überhaupt keine größere Wirkung aus.

Zusammenfassung.

Auf die Ausscheidung von in die Blutbahn gebrachtem Trypanblau hat die Milz nicht nur durch die in ihr enthaltenen Reticuloendothelzellen, sondern wahrscheinlich auch durch ein Hormon Einfluß.

Literatur.

J. Barcroft und *H. Barcroft*, Journ. of Physiol. 58, 1923. — *Ardrey* und *Eddy*, Amer. journ. of phys. 51, 1920; 58, 1921. — *Belák* und *Sághy*, Arb. d. II. Abt. d. wiss. St. T. Gesells. in Debrecen 1, 1923. — *Brinchmann*, Acta Med. scandinavica 52, 1920.

Die Wirkung des Cholins und Histamins auf die Farbstoffausscheidung aus dem Blute.

Von

Géza Farkas und Harald Tangl.

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Budapest.)

(Eingegangen am 27. Dezember 1926.)

Mit 3 Abbildungen im Text.

Die zahlreichen bisher erschienenen Arbeiten über Farbstoffausscheidung stimmen darin überein, daß die Ausscheidung von Farbstoffen von sehr vielen Komponenten abhängig ist.

Die Ausscheidung von Farbstoffen hängt erstens von deren kristalloider oder kolloidaler Natur ab, wie dies in den Arbeiten von *Frey* (1919), *Starling* (1894), *Asher* (1908) und *Magnus* (1900) ersichtlich ist. Zweitens spielt die chemische Struktur des Stoffes insofern eine Rolle, als die basischen Farbstoffe viel langsamer aus dem Blute ausscheiden als die sauren, weil nach *Krebs* und *Wittgenstein* (1926) die letzteren nicht gut absorbiert werden. Auch die Wärme ist von Einfluß auf die Farbstoffauswanderung (*Okuneff*, 1924), da an den erwärmten Stellen die Auswanderung viel schneller eintritt. Auch muß man die Dispersität der Stoffe in Erwägung ziehen.

Bei dem Ausscheiden der Farbstoffe dürfen aber nicht nur deren Konstitution und chemische Eigenschaften erwogen werden, sondern man muß auch den verschiedenen Einflüssen Rechnung tragen, die durch den Organismus bedingt sind. So gelang es *Bennhold* festzustellen, daß in Fällen von Amyloidose die Ausscheidung von Kongorot sehr rasch vor sich geht, was nach seiner Ansicht mit der Ablagerung der Farbe in den amyloidentarteten Organen zu erklären ist. Auch *Okuneff* schreibt (1924), daß im Prozeß der Abwanderung der kolloidalen Substanzen aus dem Blute, der Durchlässigkeit der Gefäßwand eine wichtige Rolle zukommt. Besonders das Gefäßsystem der Baucheingeweide hat eine große Bedeutung für die Ausscheidung der Farbstoffe. Die Anämie der Baucheingeweide hat nämlich eine gewisse Verlangsamung der Farbstoffausscheidung zur Folge, während lokale

Hyperämie, insbesondere in den Gefäßen der Baucheingeweide, eine Beschleunigung der Abwanderung der kolloidalen Stoffe veranlaßt.

Diese Daten der Autoren führten uns auf den Gedanken, zu erforschen, wie sich die Farbstoffausscheidung gegenüber den vasokonstriktorischen und vasodilatatorischen Stoffen verhält. Da die Farbstoffausscheidung längere Zeit in Anspruch nimmt, kann man natürlich nur mit Stoffen ein Resultat erreichen, deren Wirkung längere Zeit andauert. Wir suchten erst einen solchen Stoff, der das parasympathische Nervensystem in Erregung bringt, wodurch vasodilatatorische Erscheinungen zustande kommen. Wir glaubten einen solchen Stoff im Cholin gefunden zu haben, dessen parasympathicuserregende Wirkung von zahlreichen Autoren (*Bakker*, 1924, *Kuroda*, 1924, *Arai*, 1922, *Le Heux*, 1921, *Dressel* und *Lemen*, 1923) festgestellt worden ist. Als sympathicuserregendes Mittel, wodurch eine Vasokonstriktion hervorgerufen werden kann, wählten wir das Histamin, dessen Wirkung viel länger andauert als die des ebenfalls sympathicuserregenden Adrenalins (*Dale* und *Reichard*, 1924).

Methodik.

Zu den Versuchen verwendeten wir Hunde, denen wir intrakardial pro Kilogramm Körpergewicht in 2proz. Lösung 1 cg Trypanblau injizierten. Wir wählten das Trypanblau, weil nach den Mitteilungen von *Krebs* und *Wittgenstein* (1926) dieser Farbstoff besonders lange im Blute verweilt. Nach der Injektion entnahmen wir direkt aus dem Herzen nach 5 und 30 Minuten, sowie nach 1, 4 und 7 Stunden Blut. Zur Verhinderung der Gerinnung versetzten wir das Blut mit einer Lösung von Natriumoxalat und zentrifugierten die Blutkörperchen ab. Die Konzentration des Farbstoffs im Serum wurde dann in dem Kolorimeter von *Autenrieth* bestimmt, wobei wir als Standardlösung eine 1 : 5000 Trypanblaulösung in Wasser benutzten, die außerdem noch ½ Proz. Gelatine enthielt. Aus den erhaltenen Daten wurde die Konzentration des Farbstoffs unter Zuhilfenahme einer Eichungskurve berechnet. In jeder Untersuchungsreihe wurden die Hunde zuerst unter normalen Verhältnissen untersucht. Bei dem zweiten bzw. dritten Versuch wurde demselben Versuchstier Cholin bzw. Histamin verabreicht und die Wirkung dieser Stoffe untersucht. Zwischen zwei Versuchen wurde wenigstens 2 Wochen gewartet, währenddessen der in den Tieren verbliebene Farbstoff ganz ausgeschieden wurde.

Das zu unseren Versuchen verwendete Cholin und Histamin hat uns die Chemikalienfabrik *Richter* in Budapest überlassen, wofür wir auch hier unseren Dank aussprechen.

Erste Versuchsreihe.

Hund, Männchen, 10 kg. Der erste Farbstoffausscheidungsversuch wurde am 7. September 1926 ausgeführt. Der zweite Farbenausscheidungsversuch war am 22. September, wo wir gleichzeitig dem Versuchstier subkutan 0,30 g Cholin gaben. Der dritte Farbenausscheidungsversuch war am 6. Oktober, wo gleichzeitig mit dem Trypanblau subkutan 1 mg Histamin gegeben wurde.

Im ersten Versuch fanden wir:

nach	5	Minuten	nach	der	Injektion	70	Proz.	der	eingeführten	Farbenmenge
,,	30	,,	,,	,,	,,	65	,,	,,	,,	,,
,,	1	Stunde	,,	,,	,,	47	,,	,,	,,	,,
,,	4	Stunden	,,	,,	,,	26	,,	,,	,,	,,
,,	7	,,	,,	,,	,,	16	,,	,,	,,	,,

Im zweiten Versuch fanden wir:

nach	5	Minuten	nach	der	Injektion	68	Proz.	der	eingeführten	Farbenmenge
,,	30	,,	,,	,,	,,	48	,,	,,	,,	,,
,,	1	Stunde	,,	,,	,,	36	,,	,,	,,	,,
,,	4	Stunden	,,	,,	,,	19	,,	,,	,,	,,
,,	7	,,	,,	,,	,,	16	,,	,,	,,	,,

Im dritten Versuch fanden wir:

nach	5	Minuten	nach	der	Injektion	96	Proz.	der	eingeführten	Farbenmenge
,,	30	,,	,,	,,	,,	85	,,	,,	,,	,,
,,	1	Stunde	,,	,,	,,	77	,,	,,	,,	,,
,,	3	Stunden	,,	,,	,,	51	,,	,,	,,	,,
,,	5	,,	,,	,,	,,	45	,,	,,	,,	,,
,,	7	,,	,,	,,	,,	23	,,	,,	,,	,,

Die erhaltenen Daten, wiedergegeben durch ein Graphikon, zeigen das Folgende:

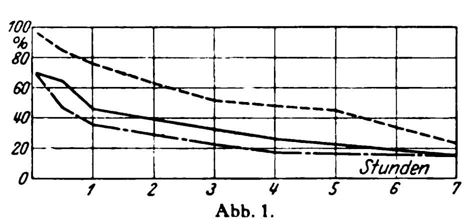


Abb. 1.

Zweite Versuchsreihe.

Hund, Männchen, 10 kg. Der erste Farbstoffausscheidungsversuch wurde am 9. September 1926 ausgeführt. Der zweite Farbenausscheidungsversuch war am 24. September, wo wir gleichzeitig dem Versuchstier subkutan 0,30 g Cholin gaben. Der dritte Farbenausscheidungsversuch war am 8. Oktober, wo gleichzeitig mit dem Trypanblau subkutan 1 mg Histamin gegeben wurde.

Im ersten Versuch fanden wir:

nach	5	Minuten	nach	der	Injektion	69	Proz.	der	eingeführten	Farbenmenge
,,	30	,,	,,	,,	,,	63	,,	,,	,,	,,
,,	1	Stunde	,,	,,	,,	50	,,	,,	,,	,,
,,	4	Stunden	,,	,,	,,	28	,,	,,	,,	,,
,,	7	,,	,,			17	,,	,,	,,	,,

Im zweiten Versuch fanden wir:

nach	5	Minuten	nach	der	Injektion	68	Proz.	der	eingeführten	Farbenmenge
„	30	„	„	„	„	52	„	„	„	„
„	1	Stunde	„	„	„	36	„	„	„	„
„	4	Stunden	„	„	„	25	„	„	„	„
„	7	„	„	„	„	13	„	„	„	„

Im dritten Versuch fanden wir:

nach	5	Minuten	nach	der	Injektion	96	Proz.	der	eingeführten	Farbenmenge
„	30	„	„	„	„	87	„	„	„	„
„	1	Stunde	„	„	„	67	„	„	„	„
„	3	Stunden	„	„	„	45	„	„	„	„
„	5	„	„	„	„	33	„	„	„	„
„	7	„	„	„	„	23	„	„	„	„

Die erhaltenen Daten, wiedergegeben durch ein Graphikon, zeigen das Folgende:

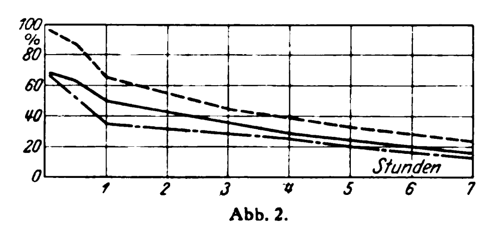


Abb. 2.

Dritte Versuchsreihe.

Hund, Männchen, 10 kg. Der erste Farbstoffausscheidungsversuch wurde am 11. September 1926 ausgeführt. Der zweite Farbenausscheidungsversuch war am 25. September, wo wir gleichzeitig dem Versuchstier subkutan 0,30 g Cholin gaben. Der dritte Farbenausscheidungsversuch war am 9. Oktober, wo gleichzeitig mit dem Trypanblau subkutan 1 mg Histamin gegeben wurde.

Im ersten Versuch fanden wir:

nach	5	Minuten	nach	der	Injektion	69	Proz.	der	eingeführten	Farbenmenge
„	30	„	„	„	„	59	„	„	„	„
„	1	Stunde	„	„	„	48	„	„	„	„
„	4	Stunden	„	„	„	31	„	„	„	„
„	7	„	„	„	„	20	„	„	„	„

Im zweiten Versuch fanden wir:

nach	5	Minuten	nach	der	Injektion	73	Proz.	der	eingeführten	Farbenmenge
„	30	„	„	„	„	52	„	„	„	„
„	1	Stunde	„	„	„	40	„	„	„	„
„	4	Stunden	„	„	„	28	„	„	„	„
„	7	„	„	„	„	16	„	„	„	„

Im dritten Versuch fanden wir:

nach	5 Minuten	nach	der	Injektion	94	Proz.	der	eingeführten	Farbenmenge
„	30 „	„	„	„	85	„	„	„	„
„	1 Stunde	„	„	„	64	„	„	„	„
„	3 Stunden	„	„	„	50	„	„	„	„
„	5 „	„	„	„	33	„	„	„	„
„	7 „	„	„	„	24	„	„	„	„

Die erhaltenen Daten, wiedergegeben durch ein Graphikon, zeigen das Folgende:

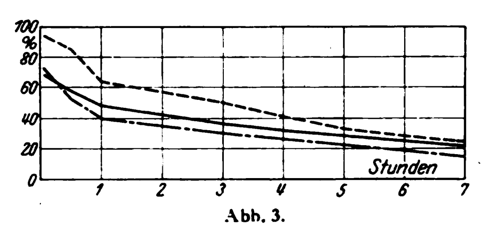


Abb. 3.

Wie aus den Daten ersichtlich, haben die vasomotorisch wirkenden Stoffe großen Einfluß auf die Farbstoffausscheidung ausgeübt. Der vasodilatatorisch wirkende Stoff Cholin wirkt auf die Farbstoffausscheidung beschleunigend. Das Histamin hatte dagegen einen verzögernden Einfluß auf die Trypanblauausscheidung, da der Farbstoff sehr lange im Blute verweilte und nur langsam ausgeschieden wurde. Die Wirkung des Cholins zeigt sich aber nicht gleich in den ersten Minuten, sondern erst nach einiger Zeit, während die Wirkung des Histamins schon in den ersten Minuten ersichtlich wird.

Zusammenfassung.

Vasomotorische Stoffe haben großen Einfluß auf die Farbstoffausscheidung aus dem Blute. Der vasodilatatorisch wirksame Stoff Cholin beschleunigt die Farbstoffausscheidung, demgegenüber der vasokonstriktorisch tätige Stoff Histamin die Ausscheidung verlangsamt.

Literatur.

Frey, Pflügers Arch. f. d. ges. Phys. **177**, 1919. — *Starling*, Journ. of Physiol. 1894, Nr. 16. — *Magnus*, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **42**, 44, 1900. — *Krebs* und *Wittgenstein*, Pflügers Arch. f. d. ges. Phys. **212**, 1926. — *Okuneff*, ebendaselbst **201**, 204, 1924. — *Bakker*, Dissertation, Utrecht 1924. — *Kuroda*, Zeitschr. f. d. ges. Med. **89**, 1924. — *Arai*, Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **193**, 1922. — *Le Heux*, ebendaselbst **190**, 1920. — *Dale* und *Richard*, Journ. of Phys. **52**, 1924.

Über den Einfluß einiger Inkretstoffe auf die Farbenausscheidung aus dem Blute.

Von

Harald Tangl.

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Budapest.)

(Eingegangen am 27. Dezember 1926.)

Mit 8 Abbildungen im Text.

Die Ergebnisse, die sich aus meinen Versuchen, in denen ich die Wirkung von Milzextrakt auf die Farbstoffausscheidung untersuchte, ergaben, veranlaßten mich zur Untersuchung der Frage, ob auch andere Hormone eine Wirkung auf die Farbstoffausscheidung ausüben. In Versuchen über die in der vorangehenden Arbeit (S. 406) berichtet wurde, untersuchte ich mit *Farkas* schon ein Hormon, das Cholin, und außerdem noch das Histamin in dieser Richtung und fand, daß diese Stoffe durch ihre vasodilatatorische bzw. vasokonstriktorische Wirkung einen Einfluß auf die Farbstoffausscheidung ausüben. In der Literatur fand ich gar keine Angaben darüber, von welcher Wirkung die Inkretstoffe auf die Farbstoffausscheidung sind. Auch Angaben über den Einfluß der Inkretstoffe auf die Vasomotoren sind nur in sehr spärlicher Zahl vorhanden. So schrieben *Siccardi* und *Loredan* (1913), daß die Extrakte der Hypophyse, der Thyreoidea, der Leber, der Milz, des Pankreas, der Nebenniere, des Eierstocks und der Hoden in verschiedenem Maße Kontraktionen der Gefäßmuskulatur hervorrufen, Thymus und Galle entfalten in höheren Konzentrationen dilatatorische Wirkung, in schwächeren rufen sie dagegen Dilatationen hervor. *Abderhalden* und *Gellhorn* (1923) behaupten, daß *Coris* Entdeckung, wonach die Schilddrüsenstoffe auf die Endapparate des N. sympathicus sensibilisierend wirken, nicht auf einer spezifischen Wirkung des Schilddrüseninkrets beruht, da sich die gleichen Ergebnisse auch bei Verwendung anderer Organe, wie Hypophysis, Thymus, Placenta, Testis, Corpus luteum, Ovar, ergeben. Die durch sie entfaltete Wirkung ließ sich im übrigen auch durch Histamin und Thyramin erhalten.

Meiner Ansicht nach besteht die Hormonwirkung auf die Farbstoffausscheidung wahrscheinlich in der vasomotorischen Wirkung dieser Stoffe. Ich unternahm daher Versuche, um die Wirkung von Inkretstoffen auf die Farbstoffausscheidung zu untersuchen. Sollte es sich dann in diesen Versuchen zeigen, daß Inkretstoffe eine Verlangsamung der Farbstoffauswanderung aus dem Blute veranlassen, dann dürfte hieraus auch die Folgerung gezogen werden, daß Inkretstoffe vasokonstriktorisch wirksam sind. Diese Versuche würden dann gewissermaßen als Kontrolle für meine mit *Farkas* in der vorangehenden Arbeit geschilderten Versuche dienen.

Die Versuche wurden auf die Weise ausgeführt, daß ich Hunden Trypanblau intrakardial einspritzte und ihnen dann alsogleich Extrakte verschiedener Inkretdrüsen unter die Haut verabfolgte. Sonst verweise ich in Hinsicht der Methodik auf die vorangegangene Arbeit.

Die Extrakte der Inkretdrüsen hat mir die Leitung der Chemischen Fabrik *Richter*, Budapest zur Verfügung gestellt, wofür ich meinen Dank ihr auch hier ausspreche.

Erste Versuchsreihe.

Hund, Männchen, 10 kg. Der erste Farbenausscheidungsversuch wurde am 7. September 1926 ausgeführt. Der zweite Farbenausscheidungsversuch war am 16. Oktober, wo ich gleichzeitig 1 ccm Thymusextrakt gab.

Im ersten Versuch fand ich:

nach	5 Minuten	nach	der	Injektion	70	Proz.	der	eingeführten	Farbenmenge
,,	30 ,,	,,	,,	,,	65	,,	,,	,,	,,
,,	1 Stunde	,,	,,	,,	47	,,	,,	,,	,,
,,	4 Stunden	,,	,,	,,	26	,,	,,	,,	,,
,,	7 ,,	,,	,,	,,	16	,,	,,	,,	,,

Im zweiten Versuch fand ich:

nach	5 Minuten	nach	der	Injektion	95	Proz.	der	eingeführten	Farbenmenge
,,	30 ,,	,,	,,	,,	70	,,	,,	,,	,,
,,	1 Stunde	,,	,,	,,	48	,,	,,	,,	,,
,,	3 Stunden	,,	,,	,,	40	,,	,,	,,	,,
,,	5 ,,	,,	,,	,,	29	,,	,,	,,	,,
,,	7 ,,	,,	,,	,,	20	,,	,,	,,	,,

Die erhaltenen Daten, wiedergegeben durch ein Graphikon, zeigen das Folgende:

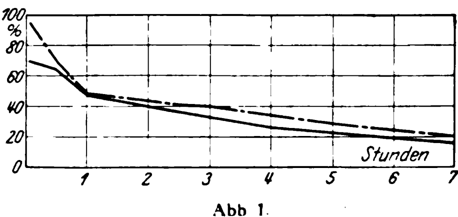


Abb. 1.

Zweite Versuchsreihe.

Hund, Männchen, 10 kg. Der erste Farbenausscheidungsversuch wurde am 9. September 1926 ausgeführt. Der zweite Farbenausscheidungsversuch war am 18. Oktober, wo ich gleichzeitig 1 ccm Thymusextrakt gab.

Im ersten Versuch fand ich:

nach	5	Minuten	nach	der	Injektion	69	Proz.	der	eingeführten	Farbenmenge
"	30	"	"	"	"	63	"	"	"	"
"	1	Stunde	"	"	"	50	"	"	"	"
"	4	Stunden	"	"	"	28	"	"	"	"
"	7	"	"	"	"	17	"	"	"	"

Im zweiten Versuch fand ich:

nach	5	Minuten	nach	der	Injektion	92	Proz.	der	eingeführten	Farbenmenge
"	30	"	"	"	"	64	"	"	"	"
"	1	Stunde	"	"	"	56	"	"	"	"
"	3	Stunden	"	"	"	33	"	"	"	"
"	5	"	"	"	"	26	"	"	"	"
"	7	"	"	"	"	16	"	"	"	"

Die erhaltenen Daten, wiedergegeben durch ein Graphikon, zeigen das Folgende:

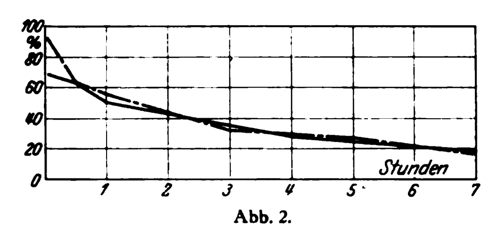


Abb. 2.

Dritte Versuchsreihe.

Hund, Männchen, 10 kg. Der erste Farbenausscheidungsversuch wurde am 11. September 1926 ausgeführt. Der zweite Farbenausscheidungsversuch war am 20. Oktober, wo ich gleichzeitig 1 ccm Thyreoideaextrakt gab.

Im ersten Versuch fand ich:

nach	5	Minuten	nach	der	Injektion	69	Proz.	der	eingeführten	Farbenmenge
"	30	"	"	"	"	59	"	"	"	"
"	1	Stunde	"	"	"	48	"	"	"	"
"	4	Stunden	"	"	"	31	"	"	"	"
"	7	"	"	"	"	20	"	"	"	"

Im zweiten Versuch fand ich:

nach	5	Minuten	nach	der	Injektion	99	Proz.	der	eingeführten	Farbenmenge
"	30	"	"	"	"	92	"	"	"	"
"	1	Stunde	"	"	"	77	"	"	"	"
"	3	Stunden	"	"	"	53	"	"	"	"
"	5	"	"	"	"	40	"	"	"	"
"	7	"	"	"	"	26	"	"	"	"

Die erhaltenen Daten, wiedergegeben durch ein Graphikon, zeigen das Folgende:

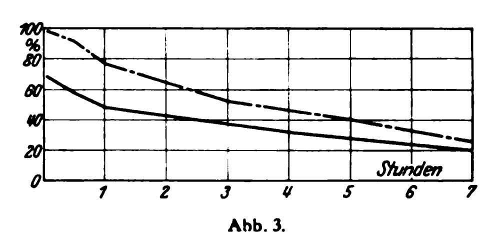


Abb. 3.

Vierte Versuchsreihe.

Hund, Männchen, 10 kg. Der erste Farbenausscheidungsversuch wurde am 11. Oktober 1926 ausgeführt. Der zweite Farbenausscheidungsversuch war am 20. Oktober, wo ich gleichzeitig 1 ccm Thyreoideaextrakt gab.

Im ersten Versuch fand ich:

nach	5 Minuten	nach der Injektion	69	Proz.	der	eingeführten	Farbenmenge
„	30 „	„ „ „	64	„	„	„	„
„	1 Stunde	„ „ „	48	„	„	„	„
„	4 Stunden	„ „ „	28	„	„	„	„
„	7 „	„ „ „	18	„	„	„	„

Im zweiten Versuch fand ich:

nach	5 Minuten	nach der Injektion	99	Proz.	der	eingeführten	Farbenmenge
„	30 „	„ „ „	93	„	„	„	„
„	1 Stunde	„ „ „	79	„	„	„	„
„	3 Stunden	„ „ „	56	„	„	„	„
„	5 „	„ „ „	41	„	„	„	„
„	7 „	„ „ „	29	„	„	„	„

Die erhaltenen Daten, wiedergegeben durch ein Graphikon, zeigen das Folgende:

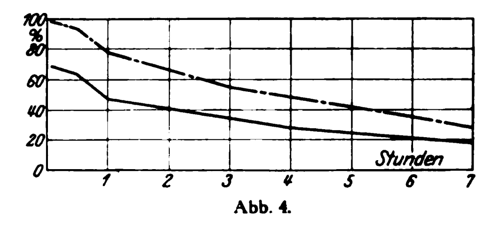


Abb. 4.

Fünfte Versuchsreihe.

Hund, Männchen, 9 kg. Der erste Farbenausscheidungsversuch wurde am 7. September 1926 ausgeführt. Der zweite Farbenausscheidungsversuch war am 30. Oktober, wo ich gleichzeitig 1 ccm Glandiutrinextrakt gab.

Im ersten Versuch fand ich:

nach	5 Minuten	nach	der	Injektion	70	Proz.	der	eingeführten	Farbenmenge
„	30 „	„	„	„	65	„	„	„	„
„	1 Stunde	„	„	„	47	„	„	„	„
„	4 Stunden	„	„	„	26	„	„	„	„
„	7 „	„	„	„	16	„	„	„	„

Im zweiten Versuch fand ich:

nach	5 Minuten	nach	der	Injektion	99	Proz.	der	eingeführten	Farbenmenge
„	30 „	„	„	„	91	„	„	„	„
„	1 Stunde	„	„	„	79	„	„	„	„
„	3 Stunden	„	„	„	50	„	„	„	„
„	7 „	„	„	„	23	„	„	„	„

Die erhaltenen Daten, wiedergegeben durch ein Graphikon, zeigen das Folgende:

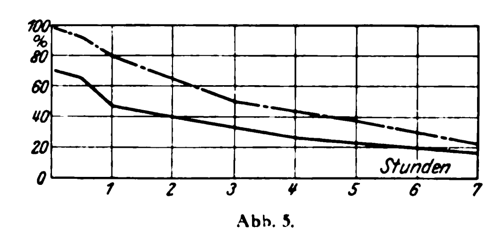


Abb. 5.

Sechste Versuchsreihe.

Hund, Männchen, 9 kg. Der erste Farbenausscheidungsversuch wurde am 9. September 1926 ausgeführt. Der zweite Farbenausscheidungsversuch war am 2. November, wo ich gleichzeitig 1 ccm Glandiutrinextrakt gab.

Im ersten Versuch fand ich:

nach	5 Minuten	nach	der	Injektion	69	Proz.	der	eingeführten	Farbenmenge
„	30 „	„	„	„	63	„	„	„	„
„	1 Stunde	„	„	„	50	„	„	„	„
„	4 Stunden	„	„	„	28	„	„	„	„
„	7 „	„	„	„	17	„	„	„	„

Im zweiten Versuch fand ich:

nach	5 Minuten	nach	der	Injektion	99	Proz.	der	eingeführten	Farbenmenge
„	30 „	„	„	„	90	„	„	„	„
„	1 Stunde	„	„	„	76	„	„	„	„
„	3 Stunden	„	„	„	52	„	„	„	„
„	5 „	„	„	„	37	„	„	„	„
„	7 „	„	„	„	25	„	„	„	„

Die erhaltenen Daten, wiedergegeben durch ein Graphikon, zeigen das Folgende:

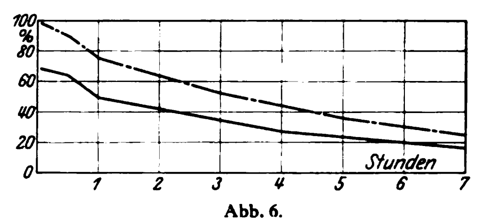


Abb. 6.

Siebente Versuchsreihe.

Hund, Männchen, 8½ kg. Der erste Farbenausscheidungsversuch wurde am 1. Oktober 1926 ausgeführt. Der zweite Farbenausscheidungsversuch war am 19. Oktober, wo ich gleichzeitig 1 ccm Testiculiextrakt gab.

Im ersten Versuch fand ich:

nach	5 Minuten	nach	der	Injektion	69	Proz.	der	eingeführten	Farbenmenge
,,	30 ,,	,,	,,	,,	64	,,	,,	,,	,,
,,	1 Stunde	,,	,,	,,	48	,,	,,	,,	,,
,,	4 Stunden	,,	,,	,,	28	,,	,,	,,	,,
,,	7 ,,	,,	,,	,,	18	,,	,,	,,	,,

Im zweiten Versuch fand ich:

nach	5 Minuten	nach	der	Injektion	93	Proz.	der	eingefühten	Farbenmenge
,,	30 ,,	,,	,,	,,	90	,,	,,	,,	,,
,,	1 Stunde	,,	,,	,,	77	,,	,,	,,	,,
,,	4 Stunden	,,	,,	,,	44	,,	,,	,,	,,
,,	7 ,,	,,	,,	,,	40	,,	,,	,,	,,

Die erhaltenen Daten, wiedergegeben durch ein Graphikon, zeigen das Folgende:

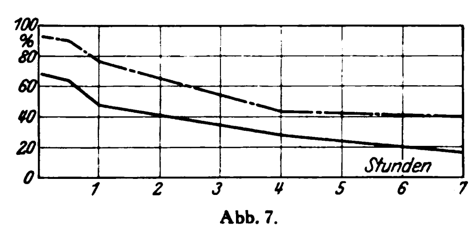


Abb. 7.

Achte Versuchsreihe.

Hund, Männchen, 8 kg. Der erste Farbenausscheidungsversuch wurde am 1. Oktober 1926 ausgeführt. Der zweite Farbenausscheidungsversuch war am 15. November, wo ich gleichzeitig 1 ccm Testiculiextrakt gab.

Im ersten Versuch fand ich:

nach	5 Minuten	nach	der	Injektion	69	Proz.	der	eingeführten	Farbenmenge
,,	30 ,,	,,	,,	,,	64	,,	,,	,,	,,
,,	1 Stunde	,,	,,	,,	48	,,	,,	,,	,,
,,	4 Stunden	,,	,,	,,	28	,,	,,	,,	,,
,,	7 ,,	,,	,,	,,	18	,,	,,	,,	,,

Im zweiten Versuch fand ich:

nach	5 Minuten	nach der Injektion	94	Proz. der eingeführten Farbenmenge
„	30 „	„ „ „	78	„ „ „ „
„	1 Stunde	„ „ „	72	„ „ „ „
„	4 Stunden	„ „ „	44	„ „ „ „
„	7 „	„ „ „	32	„ „ „ „

Die erhaltenen Daten, wiedergegeben durch ein Graphikon, zeigen das Folgende:

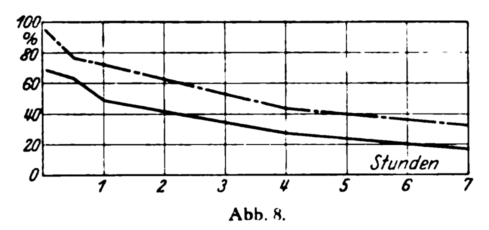


Abb. 8.

Wie aus den Versuchsreihen ersichtlich ist, hatten sich meine Erwartungen bestätigt. Die untersuchten Inkretstoffe halten tatsächlich den Farbstoff viel länger in dem Blut zurück, da die Hunde, nach der Einspritzung von Inkretstoffen, den Farbstoff länger im Blute beherbergten, als wenn sie mit solchen Stoffen nicht behandelt wurden. Unter den untersuchten Inkreten wirkte Thyreoidea und Hypophyse viel stärker als Thymus und Testiculi, obwohl die Wirkung der zwei letzteren auch schön zutage trat. Da die Ergebnisse mit den Angaben der zitierten Autoren so gut übereinstimmen, glaube ich die Ansicht aussprechen zu dürfen, daß die Wirkung der Inkretstoffe auf die Farbstoffausscheidung in der Hauptsache durch ihre vasomotorischen Einflüsse bedingt ist.

Die Arbeit wurde unter der Leitung des Herrn Prof. Dr. *G. Farkas* ausgeführt. Für seine Ratschläge bin ich ihm zu großem Danke verpflichtet.

Zusammenfassung.

Extraktstoffe aus Thyreoidea, Thymus, Hypophysis und Testis haben einen Einfluß auf die Farbstoffausscheidung aus dem Blute. Die Wirkung besteht darin, daß bei Verabreichung dieser Extraktstoffe der Farbstoff viel langsamer aus dem Blute ausgeschieden wird als bei normalen Tieren.

Literatur.

Siccardi und *Loredan*, Zeitschr. f. allg. Physiol. **15**, 1913. — *Abderhalden* und *Gellhorn*, Pflügers Arch. **199**, § 230, 1923.

Einfluß von Milz-, Thymus- und Thyreoideaextrakt auf das Wachstum von jungen Ratten.

Von

Harald Tangl.

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Budapest.)

(Eingegangen am 27. Dezember 1926.)

Mit 3 Abbildungen im Text.

Die in der neueren Zeit erschienenen Arbeiten weisen immer mehr auf die Korrelation hin, die zwischen Milz, Thyreoidea und Thymus herrscht. Auch Krankheiten, Gleichgewichtsstörungen im Organismus deuten in vieler Hinsicht hierauf. So geht in an Beriberi erkrankten Tieren eine Atrophie gewisser Organe einher in der Reihenfolge, daß am stärksten die Thymusdrüse, dann Milz und Schilddrüse zusammenschrumpfen, wogegen die Hypophyse und die Nebennieren Hypertrophie erleiden (*Garisson*, 1923). Bei Thyreoparathyreodektomie an weißen Ratten ist nicht nur eine Wachstumshemmung zu verzeichnen, sondern die Thymus verschwindet nach der Operation fast vollständig, Hoden, Nebenhoden, Eierstöcke und Uterus atrophieren (*Hammet*, 1926). Die Thymus spielt auch bei der Basedowschen Krankheit eine Rolle, da die Chirurgen viel bessere Erfolge erzielen, wenn vor der Kropfoperation partielle Thymusexstirpation vorgenommen wird (*Schwarzenberg* und *Lobeck*, 1925). Auch stellte man nach der Verfütterung von Thymus an Ratten nach einiger Zeit eine Vergrößerung der Milz und der Schilddrüse fest. Auch beim Status thymico-liphaticus hat man auffallend große Milzen beobachtet (*Schridde*, 1924).

Die drei Drüsen spielen auch im Stoffwechsel eine ähnliche Rolle. So besteht bei der Hyperfunktion der Schilddrüse erhöhter Stoffwechsel mit Polyphagie und Polydipsie. Der Wegfall der Thymusfunktion (*Tarulli*, *Lo Monaco*, *Tandler*, *Lucian*, 1913) führt zu einem wesentlichen Zurückbleiben im allgemeinen Ernährungszustand, während bei Hyperthymisation die Tiere kräftig werden und Fett in ansehnlichen

Mengen ansetzen (*Demel*, 1922). Auch die Milz hat nach *Danoff* (1919) insofern einen Einfluß auf den Stoffwechsel, als bei Ratten nach der Wegnahme der Milz der respiratorische Gaswechsel erhöht wird, und hiermit in Übereinstimmung fanden auch *Asher* und *Bernet*, daß bei entmilzten Tieren der Eiweißumsatz größer ist.

Von den genannten drei Drüsen üben zwei, namentlich Thyreoidea und Thymus, größeren Einfluß auf das Wachstum aus. So wirkt die Schilddrüse fördernd auf die Differenzierung der Kaulquappen (*Romeis*, 1924) und *Hofmeister*, *v. Eiselsberg*, *Nosser* und *Biedl* (1925) stellten bei partieller Schilddrüsenexstirpation eine Verzögerung der Ossifikation der Epiphysenknorpel und ein Zurückbleiben im Wachstum fest. *L. H. Korvatz* (1925) weist außerdem auf ein gesteigertes Längenwachstum beim Auftreten des Morbus Basedowi im jugendlichen Alter hin. Auch die Thymus hat bekanntlich großen Einfluß auf das Wachstum. So fand man nach Verfütterung von Thymussubstanz frühes Längenwachstum und späte Differenzierung bei Kaulquappen (*Romeis*, 1924, *Gudernatsch*, 1912). *Demel* (1922) fand nach Einpflanzung von Thymusgewebe in 3 Wochen alte Ratten, daß diese sich besonders kräftig entwickelten und insbesondere das Wachstum der Knochen angeregt wurde. Die Thymusdrüsen möglichst junger Tiere wirkten in dieser Hinsicht besonders gut. *Dows* und *Eddy* (1920) gaben ausgewachsenen Ratten Thymusinjektionen 3 Monate hindurch, fanden aber keine nennenswerte Unterschiede gegenüber nicht behandelten Tieren, nur das Gewicht der Thyreoidea hat etwa um 8 Proz. zugenommen. Werden die Thymusdrüsen jungen Hunden exstirpiert, so gehen sie in 1 bis 2 Monaten an Kachexie zugrunde.

Über etwaige Beziehungen der Milz zum Wachstum fand ich keine Angaben vor, so daß ich mich entschlossen habe, diese Frage an jungen Ratten zu untersuchen. Angesichts der engen Beziehungen zwischen Milz, Thyreoidea und Thymus entschloß ich mich aber, außer der Milz auch die zwei anderen Drüsen in den Kreis der Untersuchungen mit einzubeziehen.

Ausführung der Versuche.

Die Versuche führte ich an 24 jungen Ratten aus, die fast in gleicher Zeit geworfen wurden. Ich teilte sie in acht Gruppen ein, so daß in jede Gruppe drei Tiere kamen. Die Ratten erhielten alle die gleiche Nahrung (Küchenabfälle) und wurden einmal wöchentlich gewogen. Jede Woche wurden den Tieren zwei Injektionen verschiedener Inkretstoffe verabreicht. Den Inkretstoff hatte ich vor der Injektion mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt, da mir vorher Ratten einer ganzen Versuchsreihe, die die Lösungen zu konzentriert bekommen hatten, zugrunde gegangen waren. In der jetzt zu besprechenden Versuchsreihe hatte ich keinen einzigen Todesfall zu verzeichnen. Von den verdünnten Lösungen hatten die Ratten in den ersten 4 Wochen 0,2, in den zweiten 4 Wochen 0,3 ccm erhalten.

Die Kontrollgruppe erhielt, um die Versuchsbedingungen gleich zu gestalten, ebenfalls Injektionen, doch von physiologischer NaCl-Lösung. In der ersten Abteilung bespreche ich die Ergebnisse der Versuche an solchen Tieren, die mit Milz, in der zweiten an solchen, die mit Thyreoidea, in der dritten an solchen, die mit Thymus behandelt worden sind. Die Tiere wurden in Gruppen zu je drei Ratten in gemeinsamem Käfig zusammengehalten. In den folgenden Tabellen sind stets nur die Mittelwerte des Gewichts der drei Tiere eingetragen.

Die Extrakte der Inkretdrüsen hat mir die Leitung der Chemischen Fabrik Richter, Budapest, zur Verfügung gestellt, wofür ich ihr auch hier meinen Dank ausspreche.

Erste Abteilung.

Die Abteilung bestand aus fünf Gruppen zu je drei Tieren. Die Tiere wurden folgendermaßen behandelt. Gruppe 1 erhielt physiologische Kochsalzlösung (Kontrollgruppe), Gruppe 2 Thyreoideaextrakt allein, Gruppe 3 Thyreoidea- und Milzextrakt, Gruppe 4 Thyreoidea- und Thymusextrakt, endlich Gruppe 5 sowohl Thyreoidea-, als Milz- und Thymusextrakt. Wie ersichtlich, haben außer den Kontrolltieren die Tiere sämtlicher Gruppen Thyreoideaextrakt erhalten.

Tabelle I.

Gewicht in Gramm.

Woche:	1	2	3	4	5	6	7	8
Kontrolle	66,6	85,3	102,4	108,6	113,6	118,3	123,5	130,3
Thyreoidea	67,7	79,3	99,7	106,6	107,7	112,4	121,6	128,1
Thyreoidea + Thymus	64,6	74,6	91,5	111,3	113,6	119,8	125,6	142,1
Thyreoidea + Milz	67,2	85,9	94,5	102,8	110,0	116,3	121,4	127,6
Thyreoidea + Milz + Thymus	66,9	77,3	98,7	116,9	127,4	132,0	138,6	151,9

Die erhaltenen Daten, wiedergegeben durch ein Graphikon, zeigen das Folgende:

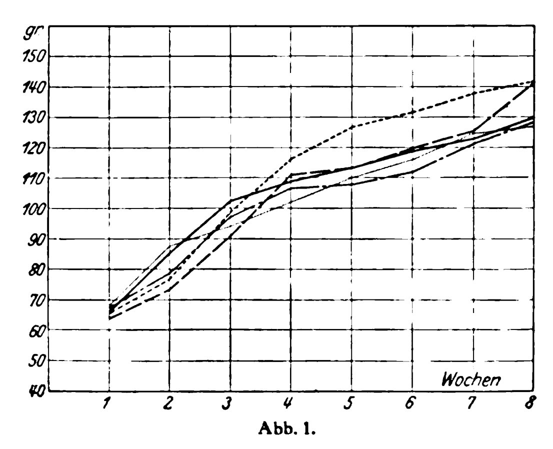


Abb. 1.

Zweite Abteilung.

Die Abteilung bestand aus fünf Gruppen zu je drei Tieren. Die Tiere wurden folgendermaßen behandelt. Gruppe 1 erhielt physiologische Kochsalzlösung (Kontrollgruppe), Gruppe 2 Thymusextrakt allein, Gruppe 3 Thymus- und Milzextrakt, Gruppe 4 Thymus- und Thyreoideaextrakt, endlich Gruppe 5 sowohl Thymus-, wie Milz- und Thyreoideaextrakt. Wie ersichtlich, haben außer den Kontrolltieren die Tiere sämtlicher Gruppen Thymusextrakt erhalten.

Tabelle II.

Gewicht in Gramm.

Woche:	1	2	3	4	5	6	7	8
Kontrolle	66,6	85,3	102,4	108,6	113,6	118,3	123,5	130,3
Thymus	65,9	89,2	102,6	109,8	119,6	125,2	133,0	141,6
Thymus + Milz . .	64,9	75,4	88,2	107,8	120,2	122,6	127,7	142,9
Thymus + Thyreoidea . .	64,6	74,6	91,5	111,3	113,6	119,8	125,6	142,1
Thymus + Milz + Thyreoidea . .	66,9	77,3	98,7	116,9	127,4	132,0	138,6	151,9

Die erhaltenen Daten, wiedergegeben durch ein Graphikon, zeigen das Folgende:

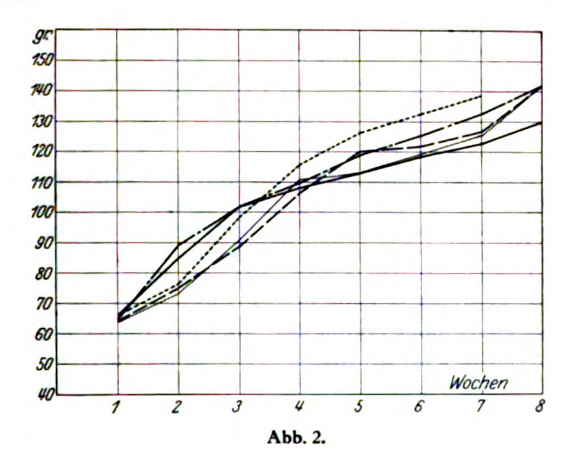


Abb. 2.

Dritte Abteilung.

Die Abteilung bestand aus fünf Gruppen zu je drei Tieren. Die Tiere wurden folgendermaßen behandelt. Gruppe 1 erhielt physiologische Kochsalzlösung (Kontrollgruppe), Gruppe 2 Milzextrakt allein, Gruppe 3 Milz- und Thyreoideaextrakt, Gruppe 4 Milz- und Thymusextrakt, endlich Gruppe 5 sowohl Milz- als Thyreoidea- und Thymusextrakt. Wie ersichtlich, haben außer den Kontrolltieren die Tiere sämtlicher Gruppen Milzextrakt erhalten.

Tabelle III. Gewicht in Gramm.

Woche:	1	2	3	4	5	6	7	8
Kontrolle	66,6	85,3	102,4	108,6	113,6	118,3	123,5	130,3
Milz	64,9	79,4	98,8	105,5	115,6	118,6	120,9	127,7
Milz + Thyreoidea .	67,2	85,9	94,5	102,8	110,0	116,3	121,4	127,6
Milz + Thymus . .	64,9	75,4	88,2	107,8	120,2	122,6	127,7	142,9
Milz + Thymus + Thyreoidea . .	66,9	77,3	98,7	116,9	127,4	132,0	138,6	151,9

Die erhaltenen Daten, wiedergegeben durch ein Graphikon, zeigen das Folgende:

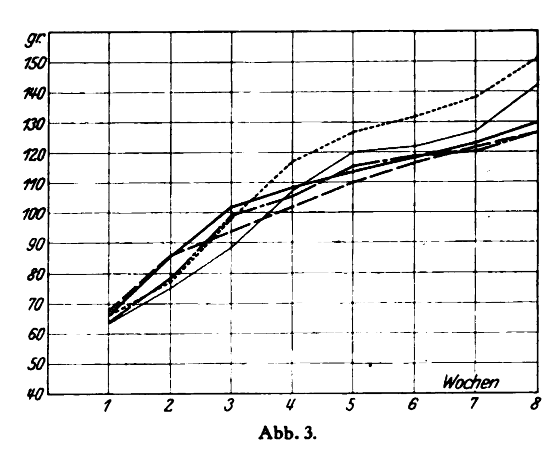


Abb. 3.

Aus den Versuchen ergibt sich, daß die Milz allein keine besondere Wirkung auf das Wachstum von jungen Ratten entfaltet. Auch die Thyreoidea allein hat keine größere Verschiebung des Gewichts verursacht. Die Wirkung der Thymus zeigte sich indessen sehr schön, indem sie das Wachstum beschleunigte. Vergleicht man die Ergebnisse der Versuche, wo zwei Extrakte verabreicht wurden, mit solchen, wo ein einziger Auszug zur Verwendung kam, dann ergibt sich, daß ein Inkretstoff den anderen nicht beeinflußt hat. Die besondere wachstumsfördernde Wirkung der Thymus kommt auch hier zum Ausdruck. Die größte Wirkung zeigte sich nach der gleichzeitigen Injektion der drei Extrakte, so daß man den Schluß ziehen kann, daß den günstigsten Einfluß auf das Wachstum das Zusammenwirken der drei Drüsen ausübt.

Die Arbeit wurde unter der Leitung des Herrn Prof. Dr. *G. Farkas* ausgeführt. Für seine Ratschläge bin ich ihm zu großem Danke verpflichtet.

Zusammenfassung.

In Versuchen an jungen Ratten zeigte sich, daß Injektion von Milzextrakt keinen Einfluß auf das Wachstum ausübt und auch die wachstumsfördernde Wirkung von Thymusauszug nicht beeinflußt.

Ähnlich wie Milzauszüge verhielt sich Thyreoideaextrakt. Thymusextrakt entfaltet den größten Einfluß auf das Wachstum, falls den Tieren gleichzeitig auch Thymus- und Milzextrakt verabreicht wurde.

Literatur.

Carisson, Jahrb. f. Kinderklinik **101**, § 168, 1923. — *Hammet*, Wistär inst. of anat. and biol., Phyladelphio 1925. — *Schwarzenberg* und *Lobeck*, Arch. latini americ. 1925. — *Schridde*, Wiener med. Wochenschr. **71**, 1924. — *Tarulli*, *Lo Monacco*, *Tandler*, *Lucian*, Ergebn. d. inn. Med. und Kinderheilk. 1913. — *Demel*, Mitt. a. d. Grenzgeb. d. Med. u. Chir. **84**, 1922. — *Danoff*, diese Zeitschr. **98**, § 44, 1919. — *Romeis*, Arch. f. Entwicklungsmech. **87**, 1913. — *Hoffmeister*, *V. Eiselsberg*, *Nosser* und *Biedl*, Ergebn. d. inn. Med. u. Kinderheilk. **27**, § 305, 1925. — *Korvatz*, ebendaselbst **27**, § 307, 1925. — *Dows* und *Eddy*, Endocrymology 1920, IV, 3. S. 240.

Über neue basische Cholinderivate.

Von

Sigmund Fränkel und Klara Nussbaum.

(Aus dem Laboratorium der Ludwig Spiegler-Stiftung in Wien.)

(Eingegangen am 29. Dezember 1926.)

Das Cholin, Trimethyläthylammoniumhydroxyd

$$(CH_3)_3N<^{CH_2-CH_2-OH}_{OH},$$

welches vor vielen Jahrzehnten von *Strecker*[1]) gefunden wurde, steht neuerdings im Vordergrund des physiologischen und medizinischen Interesses, seit es sich herausgestellt hat, daß einzelne seiner Ester, z. B. Acetylcholin, tausendmal so wirksam sind wie die Base selbst und der Äthyläther des Cholins wie Muskarin wirkt. Man hat daher versucht, eine Reihe von Derivaten des Cholins darzustellen und physiologisch zu prüfen, wobei insbesondere die zwei C-Atome enthaltende Kette und der Ersatz der Trimethylamingruppe durch andere Alkylamine den Gegenstand der Studien bildete. Wir wollen nur die Giftigkeit der Vinylverbindung Neurin [Vinyltrimethylammoniumhydroxyd $(CH_3)_3N<^{CH=CH_2}_{OH}$] und die noch viel giftigere Verbindung Muskarin $(CH_3)_3N<^{CH_2 . CH(OH)_2}_{OH}$ erwähnen, ferner das Cholinderivat, welches statt der Vinylgruppe die Acetenylgruppe trägt, $(CH_3)_3N<^{CH\equiv CH}_{OH}$, Acetenyltrimethylammoniumhydroxyd. Aber schon die Verlängerung der Seitenkette um ein C-Atom bedingt einerseits Herabsinken der Giftigkeit, da das Homologe des Neurins, das Allyltrimethylammoniumhydroxyd $(CH_3)_3N<^{CH_2 . CH=CH_2}_{OH}$, trotz des ungesättigten Charakters ein relativ ungiftiger Körper ist, andererseits bei Homocholin, $(CH_3)_3N<^{CH_2 . CH_2 . CH_2 . OH}_{OH}$, eine Verstärkung der

---

[1]) *Strecker*, A. 123, 353; 148, 76.

Wirkung gegenüber Cholin zu beobachten ist. *Reid Hunt* und *Taveau*[1]) haben sehr viele Verbindungen hergestellt, welche statt der drei Methylgruppen, Äthyl-, Propyl-, oder Amylgruppen enthalten. Sie erwiesen sich giftiger als Cholin. Ferner wurden Verbindungen dargestellt, die zwei OH-Gruppen in der Kette enthalten, und diese auch acyliert. Ebenso wurden auch gechlorte Verbindungen hergestellt. Die physiologische Wirkung aller dieser Verbindungen wurde sorgfältig studiert, ohne daß man bisher zu einem praktisch verwertbaren Resultate gelangt wäre.

Unsere Untersuchung hatte ein wesentlich anderes Ziel. Wir wollten die Basizität des Cholins verstärken, indem wir in der Äthanolgruppe im Gegensatz zu den früheren Forschern, welche saure Seitenketten eingeführt hatten, basische einführen.

Wenn es gelingt, das Cholindichlorid $(CH_3)_3N<\genfrac{}{}{0pt}{}{CH_2 \cdot CH_2Cl}{Cl}$ leicht darzustellen, so kann man das Chlor in der Äthylgruppe gegen verschiedene Basen leicht austauschen. Bis jetzt hatte nur *E. Schmidt*[2]) das Cholindichlorid zufällig gefunden, als er Cholin mit Phosphoroxychlorid und Schwefelsäure in Neurin überführen wollte. Ohne den Umweg über das Cholin wurde die erstgenannte Verbindung noch nicht dargestellt.

Darstellung von Cholindichlorid, $(CH_3)_3N<\genfrac{}{}{0pt}{}{CH_2.CH_2Cl}{Cl}$.

Wir haben Cholindichlorid auf einfache Weise gewonnen, indem wir reinstes symmetrisches Dichloräthan, $ClCH_2 . CH_2Cl$, monomolekular mit Trimethylamin in alkoholischer Lösung zusammenbrachten und lange stehen ließen.

100 g absolut alkoholische Lösung, welche 33 g Trimethylamin enthielt, wurde mit rein destilliertem, symmetrischem Dichloräthan $ClCH_2 . CH_2Cl$, versetzt und 10 Tage stehengelassen. Es schieden sich 12 g Kristalle ab. Die Lösung wurde nach 12 Stunden in zugeschmolzenen Röhren im Wasserbad erhitzt, hierauf der Alkohol im Vakuum abdestilliert und die zurückgebliebene Kristallmasse in Alkohol aufgenommen. Es schieden sich sehr kleine, schöne, stark hygroskopische Kristalle ab. Die Ausbeute betrug weitere 8 g, zusammen also 20 g. Ausbeute 22,5 Proz. der Theorie.

Da die hygroskopischen Kristalle nicht gut analysierbar waren, analog den Erfahrungen bei Cholin selbst, haben wir die Platinverbindung dargestellt, um die Substanz zu identifizieren.

---

[1]) Journ. of Pharmakol. and exper. Therap., Vol. 1, Nr. 3, Oktober 1909; Bulletin Hygienic Laboratory of Treasury Departement, Nr. 73, März 1911.

[2]) A. **337**, 56.

Schmidt[1]) beschrieb das aus Cholin gewonnene Cholindichloridplatinat als kleine, glänzende Oktaeder, welche bei 250° noch nicht schmolzen und, aus heißem, salzsäurehaltigem Wasser umkristallisiert, 29,87 Proz. Platin enthielten (berechnet 29,81 Proz.).

Wir erhielten bei der Fällung der absolut alkoholischen Lösung mit absoluter alkoholischer Platinchloridlösung feine, orangegefärbte Kristalle, welche abgesaugt und mit absolutem Alkohol gewaschen, aus heißem, salzsäurehaltigem Wasser umkristallisiert wurden. Nach Abkühlung der Lösung erhielt man feine, glänzende, orangefarbige, oktaederförmige Kristalle, welche bei 250 bis 260° unter Zersetzung schmolzen, also sich analog verhielten wie *Schmidts* Verbindung. Auch nach mehrfachem Umkristallisieren wurde der Schmelzpunkt nicht schärfer und war von der Schnelligkeit des Erhitzens abhängig. Die Analyse der im Vakuum getrockneten Substanz lieferte folgende Resultate.

5,815 mg Sbst.: 3,884 mg CO_2 und 2,193 mg H_2O,
6,007 „ „ 4,021 „ CO_2 „ 2,303 „ H_2O.

Stickstoff nach *Dumas-Pregl*:

5,995 mg Sbst.: 0,223 ccm N_2 (17°, 745 mm),
6,014 „ „ 0,224 „ N_2 (17°, 744 „).

Mikrobestimmung des Halogens nach *Carius*:

7,308 mg Sbst.: 12,755 mg AgCl,
6,955 „ „ 12,176 „ AgCl.

Mikrobestimmung des Platins nach *Pregl*:

4,473 mg Sbst.: 1,335 mg Pt,
6,327 „ „ 1,887 „ Pt.

$$\left[\begin{matrix}CH_3\\CH_3\\CH_3\end{matrix}\!>\!N\!<\!\begin{matrix}CH_2.CH_2Cl\\Cl\end{matrix}\right]_2 PtCl_4.$$

Ber. für $C_{10}H_{26}N_2Cl_8Pt$:	C 18,38	H 4,01	N 4,29	Cl 43,43	Pt 29,81
Gef.	C 18,22	H 4,22	N 4,30	Cl 43,18	Pt 29,84
	C 18,26	H 4,29	N 4,31	Cl 43,41	Pt 29,82

Dieses Platinsalz wurde dann in Wasser aufgeschlemmt und erhitzt und dann in die heiße Lösung Schwefelwasserstoff eingeleitet. Nachdem das Platinat vollständig zerlegt war, wurde es von Platinsulfid abfiltriert und das Filtrat am Wasserbad zweimal bis zur Trockne eingedampft. Wir erhielten zerfließliche Blätter, aus denen wir eine absolute alkoholische Lösung mit bestimmtem Gehalt bereiteten.

Darstellung von Trimethylaminäthylaminchlorid,

$$(CH_3)_3N\!<\!\begin{matrix}CH_2.CH_2.NH_2\\Cl\end{matrix}.$$

Wir ließen 5 g Cholindichlorid in absolut alkoholischer Lösung mit absolut alkoholischem Ammoniak im Überschuß in zugeschmolzenen

[1]) A. 337, 56.

Glasröhren 14 Tage stehen. Hierauf wurden die Röhren 12 Stunden im siedenden Wasserbad gehalten. Die bisher farblose Lösung färbte sich dabei dunkelgelb. Nachher wurde die Lösung im Vakuum stark konzentriert und im Vakuumexsikkator sich selbst überlassen. Es kristallisierte mehrmals Salmiak aus, welcher in bekannter Weise identifiziert wurde. Schließlich kristallisierte eine Fraktion in schönen weißen Tafeln, welche stark hygroskopisch waren und sich in absolutem Alkohol leicht auflösten.

Wegen der großen Zerfließlichkeit der Substanz wurde das Platinsalz zur Analyse gebracht.

Die absolut alkoholische Lösung wurde mit absolut alkoholischer Platinchloridlösung versetzt, wobei eine orangegelbe Fällung entstand. Diese wurde abfiltriert, gewaschen und aus wenig salzsäurehaltigem, siedendem Wasser umkristallisiert.

Die Analyse der vakuumgetrockneten Substanz ergab folgende Werte:

5,333 mg Sbst.: 2,250 mg CO_2 und 1,597 mg H_2O,
4,999 „ „ 2,105 „ CO_2 „ 1,501 „ H_2O.

Stickstoffbestimmung nach *Dumas-Pregl*:

5,210 mg Sbst.: 0,263 ccm N_2 (17°, 721 mm),
5,003 „ „ 0,253 „ N_2 (21°, 726 „).

Mikrobestimmung des Halogens nach *Carius*:

5,371 mg Sbst.: 8,969 mg AgCl,
6,162 „ „ 10,281 „ AgCl.

Platinbestimmung nach *Pregl*:

5,333 mg Sbst.: 2,033 mg Pt,
4,999 „ „ 1,902 „ Pt.

$$\left[\begin{matrix} CH_3 \\ CH_3 \\ CH_3 \end{matrix} \right> N \left< \begin{matrix} CH_2.CH_2.NH_2.HCl \\ Cl \end{matrix} \right. \cdot PtCl_4.$$

Ber. für $C_5H_{16}N_2Cl_6Pt$:	C 11,72	H 3,14	N 5,47	Cl 41,54	Pt 38,12
Gef.:	C 11,51	H 3,35	N 5,60	Cl 41,31	Pt 38,04
	C 11,49	H 3,35	N 5,60	Cl 41,27	Pt 38,06

Cholindichlorid und Ammoniak setzen sich also in der Weise um, daß das Cl-Atom in der Alkylgruppe sich gegen NH_2 austauschen läßt.

Darstellung von Trimethyläthylmethylamin,

$$(CH_3)_3N\left<\begin{matrix} CH_2.CH_2.NH.CH_3 \\ Cl \end{matrix}\right. .$$

5 g Cholindichlorid in absolut alkoholischer Lösung wurden mit einer 33 proz. absolut alkoholischen Lösung von Methylamin im Überschuß versetzt und 14 Tage stehengelassen. Die früher farblose Lösung färbte sich dabei gelblich. Nachher wurde die Lösung 10 Stunden

lang in zugeschmolzenen Röhren im Wasserbad gekocht, wobei die Lösung dunkler wurde. Nach Öffnen der Röhren wurde der Inhalt im Vakuum eingeengt. Es blieb eine stark gefärbte Kristallmasse zurück mit einem durchdringenden, unangenehmen Geruch (kein Amingeruch). Der Rückstand wurde in Alkohol aufgenommen und langsam fraktioniert kristallisieren gelassen. Die ersten Fraktionen erwiesen sich als Methylaminchlorhydrat. (Schmelzpunkt bei 225 bis 227° unter Sublimieren.) Die Menge des Methylaminchlorhydrats war 1,74 g, also fast die theoretische Menge bei der erwarteten Reaktion. Nach längerer Zeit schieden sich aus der Mutterlauge im Exsikkator im Vakuum feine, glänzende, weiße Kristalle aus. Durch Behandeln mit Tierkohle und mehrmaliges Umkristallisieren wurden sie gereinigt und in Alkohol aufgenommen.

Die Hälfte der alkoholischen Lösung wurde mit einer alkoholischen Sublimatlösung versetzt. Es entstand sofort eine weiße Fällung. Sie wurde über Nacht zum Absitzen des Niederschlags stehengelassen. Die Fällung löste sich auf und verharzte zu einer quecksilberhaltigen, dunklen Masse, die weiter nicht untersucht wurde. Da nun die Darstellung einer Sublimatverbindung nicht zu dem gewünschten Ziele führte, wurde die andere Hälfte der alkoholischen Lösung mit einer kaltgesättigten alkoholischen Cadmiumchloridlösung gefällt. Die sofort entstandene Fällung war gelb, löste sich nicht mehr auf, aber eine harzige Substanz mit dem schon erwähnten unangenehmen Geruch setzte sich ab. Es wurde davon abdekantiert, der Niederschlag filtriert. Es wurde versucht, die Substanz aus einigen Tropfen cadmiumchloridhaltigen Wassers umzukristallisieren, was aber wegen der Zerfließlichkeit der Substanz nicht gelang. Um die Substanz zurückzugewinnen, wurde die wässerige Lösung mit Alkohol gefällt und nach mehrmaligem Auflösen in Wasser und Fällen mit Alkohol vollständig gereinigt. Die Fällung war ein kristallinisches, hellgelbes Pulver, welches bei 80° schmolz, später erstarrte und sich langsam von 200° an zersetzte.

Trimethyläthylmethylamincadmiumchlorid.

Mit der lufttrockenen Substanz wurde eine Feuchtigkeitsbestimmung vorgenommen. Sie wurde erst im Vakuum, dann im elektrischen Trockenschrank bei 120° zur Konstanz getrocknet.

8,530 mg Sbst.: 8,007 mg Rückstand.

Die Mikroanalyse der Substanz nach *Pregl* ergab folgende Werte:

4,443 mg Sbst.: 2,060 mg CO_2 und 1.072 mg H_2O,
4,197 „ „ 1,940 „ CO_2 „ 1,050 „ H_2O.

Stickstoff nach *Dumas-Pregl*:

5,719 mg Sbst.: 0,207 ccm N_2 (23°, 731 mm),
5,992 „ „ 0,219 „ N_2 (21°, 740 „).

Für die Cadmiumbestimmung wurde die eingewogene Substanz in der Mikromuffel mit konzentrierter Schwefelsäure abgeraucht und das zurückgebliebene weiße Cadmiumsulfat gewogen.

4,595 mg Sbst.: 3,720 mg $CdSO_4$,
4,971 „ „ 4,082 „ $CdSO_4$.

Mikrohalogenbestimmung nach *Carius-Pregl*:

4,758 mg Sbst.: 6,358 mg AgCl,
5,620 „ „ 7,561 „ AgCl.

Ber. für $C_8H_{23}N_2Cl_7Cd_3O$:	C 12,82	H 3,09	N 3,74	Cd 45,04	Cl 33,15	C_2H_5OH 6,15
Gef.	C 12,60	H 2,70	N 4,02	Cd 43,65	Cl 33,06	C_2H_5OH 6,13
	C 12,62	H 2,80	N 4,13	Cd 44,27	Cl 33,28	

Diese Bruttoformel $C_8H_{23}N_2Cl_7Cd_3O$ läßt sich auflösen in

$$\begin{matrix} CH_3 \\ CH_3 \\ CH_3 \end{matrix} \!\!> N \!<\! \begin{matrix} CH_2.CH_2.NH.CH_3 \\ Cl \end{matrix} \cdot 3\,(CdCl_2) + C_2H_5.OH.$$

Zur Kontrolle wurde die bei 120° im Vakuum zur Konstanz getrocknete Substanz verbrannt

4,712 mg Sbst.: 1,765 mg CO_2 und 1,232 mg H_2O.

Stickstoff nach *Dumas-Pregl*:

5,559 mg Sbst.: 0,198 ccm N_2 (17°, 728 mm).

Mikrobestimmung des Halogens nach *Carius*:

5,525 mg Sbst.: 7,834 mg AgCl.

Mikro-Cadmiumbestimmung:

5,227 mg Sbst.: 4,605 mg $CdSO_4$.

$$\begin{matrix} CH_3 \\ CH_3 \\ CH_3 \end{matrix} \!\!> N \!<\! \begin{matrix} CH_2.CH_2.NH.CH_3 \\ Cl \end{matrix} \cdot 3\,(CdCl_2).$$

Ber. für $C_6H_{17}Cl_7N_2Cd_3$:	C 10,25	H 2,44	N 3,98	Cl 35,32	Cd 47,99
Gef.	C 10,23	H 2,92	N 4,02	Cl 35,25	Cd 47,51

Trimethylaminäthylmethylaminplatinchlorid.

Das Cadmiumsalz des Körpers wurde in Wasser aufgelöst, bis zum Sieden erhitzt und mit Schwefelwasserstoff zerlegt, nach vollständiger Zerlegung vom Cadmiumsulfid abfiltriert, zweimal bis zur Trockne eingedampft, in Alkohol aufgenommen und mit einer alkoholischen Platinchloridlösung gefällt.

Die entstandene Fällung war orangegelb und fein kristallinisch. Sie wurde abfiltriert und nach dem Trocknen aus sehr wenig heißem, salzsäurehaltigem Alkohol umkristallisiert. Es schießen schöne, große, orangegefärbte Kristalle an, welche abfiltriert und gewaschen wurden.

Die lufttrockene Substanz schmolz bei 80°, erstarrte später und verkohlte bei 225°.

Um eine Feuchtigkeitsbestimmung durchzuführen, wurde die lufttrockene Substanz erst im Vakuum, dann im Trockenschrank bei 120° zur Konstanz getrocknet.

2,762 mg Substanz gaben 1,460 mg Trockenrückstand.

Die Mikro-Platinbestimmung der lufttrockenen Substanz ergab folgende Werte:

3,537 mg Substanz: 1,345 mg Pt,
4,443 „ „ 1,683 „ Pt.

$$\text{Berechnet für: } \begin{matrix} CH_3 \\ CH_3 \\ CH_3 \end{matrix} \!\!>\! N \!<\! \begin{matrix} CH_2 . CH_2 . NH . CH_3 \\ \\ Cl \end{matrix} \cdot PtCl_4 + {}^1/_2 C_2H_5 \cdot OH.$$

38,07 Pt, 4,49 $C_2H_5 . OH$
Gef.: 38,02 „ 4,71 $C_2H_5 . OH$.
37,88 „

Zur Kontrolle wurde eine Platinbestimmung der von Kristallalkoholat befreiten, bei 120° getrockneten Substanz durchgeführt.

6,711 mg Substanz: 2,675 mg Pt.

Berechnet für $C_6H_{17}N_2Cl_5Pt$: 39,86 Proz. Pt.
Gef.: 39,83 „ Pt.

$$\begin{matrix} CH_3 \\ CH_3 \\ CH_3 \end{matrix} \!\!-\! N \!<\! \begin{matrix} CH_2 . CH_2 \\ \\ Cl \quad\quad Cl \end{matrix} \!>\! N \!-\!\! \begin{matrix} CH_3 \\ CH_3 \\ CH_3 \end{matrix}$$

Es kristallisiert also sowohl die Cadmium — als die Platinverbindung mit je 1 bzw. ½ Mol. Alkohol.

Darstellung von Trimethylaminäthyltrimethylamindichlorid (Ditrimethylaminäthyliumdichlorid).

Eine absolut alkoholische Lösung von 5 g Cholindichlorid wurde mit einer absolut alkoholischen Lösung von Trimethylamin (33 proz.) im Überschuß versetzt und 14 Tage stehengelassen, dann in Glasröhren gegossen, zugeschmolzen und 12 Stunden lang im Wasserbad gekocht. Nach Öffnen der Röhren wurde der Inhalt im Vakuum bis zum Kristallisieren eingeengt, wobei sich die Lösung gelb färbte. Die ausgeschiedene Kristallmasse wurde in absolutem Alkohol aufgenommen. In der Kälte kristallisierten weiße Blätter aus, welche stark zerfließlich waren. Die Mutterlauge wurde im Exsikkator im Vakuum langsam fraktioniert kristallisieren gelassen. Die ersten drei Fraktionen erwiesen sich nach ihren Platinsalzen als Cholindichlorid. Die Menge war sehr gering, ungefähr 1 g, also 20 Proz. des Ausgangsmaterials ist nicht in Reaktion getreten.

Trimethylaminäthyltrimethylamindichlorid-cadmiumchlorid.

Die Mutterlauge wurde im Vakuum weiter bis zur Sirupkonsistenz eingeengt. Nach längerer Zeit schieden sich sehr kleine und stark zerfließliche Kristalle aus, die sich nicht absaugen ließen. Sie wurden daher in Alkohol aufgenommen und mit einer kalt gesättigten alkoholischen Cadmiumchloridlösung versetzt. Es entstand eine schwach gelbe Fällung, die abfiltriert und nach Kochen mit Tierkohle aus heißem

cadmiumchloridhaltigen Wasser umkristallisiert wurde. Nach mehrmaligem Umkristallisieren wurde sie bis zur Konstanz getrocknet. Die Substanz schmolz bis 320⁰ nicht, sondern blieb vollkommen unverändert.

Die Mikroanalyse nach *Pregl* ergab folgende Werte:

4,692 mg Sbst.: 2,845 mg CO_2 und 1,664 mg H_2O,
4,277 „ „ 2,593 „ CO_2 „ 1,556 „ H_2O.

Stickstoff nach *Dumas-Pregl*:

6,235 mg Sbst.: 0,275 ccm N_2 (24⁰, 729 mm),
8,975 „ „ 0,389 „ N_2 (25⁰, 763 „).

Mikro-Cadmiumbestimmung:

5,893 mg Sbst.: 4,226 mg $CdSO_4$,
5,342 „ „ 3,871 „ $CdSO_4$.

Mikrobestimmung des Halogens nach *Carius*:

7,435 mg Sbstz.: 11,180 mg AgCl.

Berechnet für:

$$\begin{matrix} CH_3 \\ CH_3 \\ CH_3 \end{matrix}\!>\!N\!<\!\begin{matrix} CH_2\!-\!CH_2 \\ Cl \quad\quad Cl \end{matrix}\!>\!N\!<\!\begin{matrix} CH_3 \\ CH_3 \\ CH_3 \end{matrix} \cdot 2\,CdCl_2.$$

Ber. für $C_8H_{22}N_2Cl_6Cd_2$: C 16,45, H 3,80, N 4,80, Cd 38,52, Cl 36,54.
Gef.: C 16,54, H 3,97, N 5,00, Cd 38,67, Cl 37,20,
C 16,63, H 4,07, N 4,95, Cd 39,07.

Das Cadmiumsalz wurde in Wasser gelöst und mit Schwefelwasserstoff zerlegt. Nach vollständiger Zerlegung wurde es zweimal bis zur Trockene eingedampft. Es blieb eine weiße Kristallmasse zurück, welche in Alkohol gelöst wurde.

Trimethylaminäthyltrimethylamindichlorid-platinchlorid.

Die alkoholische Lösung der Substanz wurde mit einer alkoholischen Platinchloridlösung versetzt. Es entstand eine feinkristallinische, gelbe Fällung, die abfiltriert, mit Alkohol gewaschen und getrocknet wurde. Nachher wurde aus sehr wenig heißem, salzsäurehaltigem Wasser umkristallisiert. Es schießen glänzende, dunkelorangefarbige Kristalle an. Nach scharfem Absaugen wurden sie getrocknet. Der Schmelzpunkt wurde am Bloc Maquenne ausgeführt. Bei 80⁰ schmolz die Substanz, bei 100⁰ erstarrte sie wieder und verkohlte rasch bei 220⁰.

Da die Vermutung nahe lag, daß die Verbindung Kristallwasser oder -Alkohol enthält, wurde eine Feuchtigkeitsbestimmung vor-

genommen. Die lufttrockene Substanz wurde erst im Vakuum, dann im Trockenschrank bei 120⁰ zur Konstanz getrocknet.

8,384 mg Sbst.: 8,111 mg Rückstand.

Die Platinbestimmung ergab folgende Werte:

7,128 mg Sbst.: 2,438 mg Pt,
8,314 „ „ 2,851 „ Pt.

Berechnet für $C_8H_{24}N_2Cl_6PtO$: Pt 34,12, H_2O 3,15.
Gef.: Pt 34,20, H_2O 3,25,
Pt 34,29.

$$\begin{array}{l} CH_3\diagdown \quad \diagup CH_2-CH_2\diagdown \quad \diagup CH_3 \\ CH_3-N \qquad\qquad\qquad\quad N-CH_3 \cdot PtCl_4 + H_2O. \\ CH_3\diagup \quad \diagdown Cl \qquad Cl\diagup \quad \diagdown CH_3 \end{array}$$

Zur Kontrolle wurde noch eine Platinbestimmung von der vom Kristallwasser befreiten Substanz gemacht.

6,139 mg Sbst.: 2,168 mg Pt,
5,811 „ „ 2,050 „ Pt.

Berechnet für $C_8H_{22}N_2Cl_6Pt$: 35,22 Pt.
Gef.: 35,31 Pt,
35,28 Pt.

Trimethylaminäthyltrimethylamindichloridgoldchlorid.

Eine kleine Probe der Substanz wurde in absolutem Alkohol gelöst und mit einer alkoholischen Goldchloridlösung versetzt. Es entstand eine goldgelbe, glänzende Kristallfällung. Nach dem Filtrieren wurde aus einigen Tropfen Wasser umkristallisiert (Schmelzpunkt 165⁰), im dunklen Vakuum getrocknet und analysiert.

6,843 mg Sbst.: 2,608 mg Au.
7,225 „ „ 2,751 „ Au.

Berechnet für $C_8H_{22}N_2Cl_5Au$: Ber.: 37,87.
Gef.: 38,11,
38,08.

$$\begin{array}{l} CH_3\diagdown \quad \diagup CH_2-CH_2\diagdown \quad \diagup CH_3 \\ CH_3-N \qquad\qquad\qquad\quad N-CH_3 \cdot AuCl_3. \\ CH_3\diagup \quad \diagdown Cl \qquad Cl\diagup \quad \diagdown CH_3 \end{array}$$

Umsetzung von Cholindichlorid mit zyklischen Basen.

Wir legten den Hauptwert darauf, Verbindungen zu bekommen, in denen statt des OH in der Äthanolgruppe des Cholins zyklische Basen stehen. Besonders pharmakologische Gesichtspunkte haben uns veranlaßt, sehr viel Mühe und Zeit zu verwenden, Verbindungen dieser Art darzustellen. Leider wurde das gewünschte Ziel nach dieser Richtung hin nicht erreicht, weil die Reaktion nicht im gleichen Sinne lief wie bei den einfachen Basen der aliphatischen Reihe.

Wir haben vorerst versucht, die gechlorte Base mit Chinolin und Oxychinolin umzusetzen. Wir gingen in der Weise vor, daß wir eine sehr konzentrierte alkoholische Lösung von Cholindichlorid mit frisch destilliertem Chinolin bzw. Oxychinolin im Überschuß versetzten und am Rückflußkühler 8 Stunden erhitzten. Dann wurde im Vakuum das Chinolin abdestilliert, es resultierte ein Rückstand, der eine rotbraune Flüssigkeit darstellte mit einem durchdringenden scharfen Geruch. Die Flüssigkeit wurde mit Äther ausgeschüttelt und dann weiter eingeengt, wobei sich ein wenig Chinolinchlorhydrat abschied. Aber selbst nach sehr langem Stehen konnte aus dem harzigen Rückstand keine neue Kristallfraktion gewonnen werden. Die Versuche, das in Wasser unlösliche, in siedendem Alkohol lösliche Harz mittels Sublimat, Pikrinsäure und mit Platinchlorid aufzuarbeiten, gaben kein verwertbares Resultat. Wir erhielten zwar kristallisierte Pikrate, deren Analysenwerte aber keine rechenbaren Resultate gaben.

Wir zerlegten diese Pikrate in bekannter Weise mit Schwefelsäure, entfernten die Schwefelsäure mit Bariumcarbonat und fällten mit Platinchlorid. Aber auch das Platinat erwies sich als durchaus nicht einheitliche Substanz.

Die Hauptmasse des Reaktionsprodukts war ein rotgefärbtes Harz, jedenfalls konnten wir sehen, daß die von uns gesuchte Chinolinverbindung nicht entstanden war.

Über eine Dodecandiaminodicarbonsäure aus Casein.

Von

Sigmund Fränkel und Max Friedmann.

(Aus dem Laboratorium der L. Spiegler-Stiftung in Wien.)

(Eingegangen am 29. Dezember 1926.)

Im hiesigen Laboratorium wurden zahlreiche Arbeiten über die Einwirkung des Trypsins auf Eiweißkörper ausgeführt, wobei Versuchsbedingungen eingehalten wurden, unter denen diese Reaktionen bis dahin noch nicht studiert wurden. Es hat sich bei diesen Versuchen, bei denen Eiweiß mehrere Monate mit Trypsin verdaut wurde, gezeigt, daß nach der Spaltung der Eiweißkörper durch Trypsin in Aminosäuren manche dieser Aminosäuren im Laufe der Zeit unter gärungsverhindernden Kautelen der langen Wirkung des Ferments ausgesetzt, noch weitere Veränderungen erfahren. Bei diesen Arbeiten gelang es, ohne Anwendung der üblichen Reagenzien und der bisher üblichen komplizierten Methoden, wie z. B. der Estermethode von *E. Fischer*, auf eine sehr einfache Weise das entstehende Gemisch von Aminosäuren in seine einzelnen Bestandteile zu zerlegen und größtenteils durch fraktionierte Kristallisation und Wahl passender Lösungsmittel zu entmischen.

Dieses Verhalten des Verdauungsprodukts erleichtert das Auffinden der Spaltungsprodukte des Eiweißes bei der prolongierten Trypsinverdauung.

Bis jetzt wurde gefunden:

Daß das l-Tryptophan in das d-Tryptophananhydrid übergeht[1]). Ebenso geht das l-Tyrosin in d-Tyrosinanhydrid über. Beide Aminosäuren gehen vorerst durch eine Art *Walden*scher Umlagerung von der l- in die d-Form über und nachher in die Anhydride. Die Anhydridbildung wurde ferner beobachtet[2]) bei Prolin, Leucin und vielleicht auch bei Histidin.

---

[1]) *S. Fränkel* und *Feldsberg*, diese Zeitschr. **120**, 218, 1921.

[2]) *S. Fränkel* und *Gallia*, *Liebster*, *Rosen*, ebendaselbst **145**, 295, 1924.

Einzelne Aminosäuren ändern sich gar nicht, wie das l-Prolin, d-iso-Leucin und d-Valin, welche auf höchst einfache Weise isoliert wurden, während bekanntlich d-iso-Leucin z. B. nur nach einem äußerst komplizierten Verfahren von *F. Ehrlich* aus dem Gemenge beider Leucine abgetrennt wurde.

Einzelne, wie d-Alanin, d-Glutaminsäure, l-Oxyprolin, l-Serin und d-Valin werden racemisiert. Auch Decarboxylierung von Glykokoll wurde beobachtet, wobei Methylamin entstand[1]).

Wir haben nun Casein nach der gleichen Methode enzymatisch hydrolysiert und die Produkte aufgearbeitet, und es ist uns gelungen, neben einigen bekannten und in früheren Arbeiten beschriebenen Verbindungen mehrere andere darzustellen, die nicht bekannt oder wenig studiert sind. Vor allem anderen ist es uns gelungen, auf eine höchst einfache Weise eine Substanz darzustellen, die vielleicht in Beziehung steht oder identisch ist mit einer Substanz, die *Z. Skraup* und *Emil Fischer* und *Abderhalden* beschrieben haben. Diese Forscher haben nach verschiedenen Verfahren Substanzen aus Casein dargestellt, deren Eigenschaften aber nicht in allen Punkten untereinander korrespondieren und auch nicht mit der von uns dargestellten Verbindung.

So hat *Z. Skraup* unter dem Namen Caseinsäure eine Verbindung erhalten und beschrieben, die er durch Hydrolyse des Caseins erhielt, und zwar auf eine recht komplizierte Weise. Er veresterte die durch Säurehydrolyse gewonnenen Aminosäuren nach dem Verfahren von *Emil Fischer* und holte mit alkoholhaltigem Äther den darin löslichen Anteil der Chlorhydrate der Aminosäureester heraus. Den in Äther unlöslichen Anteil fällt er mit 50proz. Phosphorwolframsäure. Das Filtrat von der Fällung wird in bekannter Weise mit Ätzbaryt von der überschüssigen Phosphorwolframsäure befreit. Das von Baryt befreite Filtrat wird hierauf eingeengt, es kristallisiert Leucin und Tyrosin aus. Aus der Mutterlauge dieser Aminosäuren wird in bekannter Weise das Glutaminsäurechlorhydrat entfernt und das Filtrat hierauf mit Kupfercarbonat gekocht. Man bekommt dann die Kupferchloriddoppelsalze der Kupfersalze der Aminosäuren. Setzt man nun zu dem Filtrat die gleiche Menge Alkohol zu, so fällt eine Verbindung heraus, die *Skraup* „caseansaures Kupfer“ nennt. Das Filtrat engt er ein und fällt schließlich mit absolutem Alkohol. Die Fällung benennt er „caseinsaures Kupfer“. Sie besteht aus zwei Aminosäuren gleicher Zusammensetzung, aber differenter Schmelzpunkte. Denn, wenn man die Kupfersalze zerlegt, erhält man eine optisch aktive Säure vom Schmp. 228° und eine inaktive Aminosäure vom Schmp. 243 bis 244°. Beide geben bei der Analyse die gleichen Werte, welche sich auf die Formel $C_{12}H_{24}O_5N_2$ rechnen lassen.

In der ersten Mitteilung[2]) beschrieb *Skraup* erst die Caseinsäure als eine Verbindung mit der Bruttoformel $C_{12}H_{16}O_5N_2$, und zwar als eine zweibasische Säure, die in zwei Modifikationen auftreten kann, von denen eine bei 226° schmilzt, schwach rechsdrehend ist und in leidlich ausgebildeten

[1]) *S. Fränkel* und *P. Jellinek*, diese Zeitschr. **130**, 592, 1922.
[2]) Ber. **37**, 1596, 1904.

Prismen kristallisiert. Die andere schmilzt bei 246°, ist inaktiv und bildet prismatische Kristalle, welche aber undeutlich ausgebildet sind. In der darauffolgenden Arbeit[1]) beschrieb er die aktive Säure mit der Bruttoformel $C_{12}H_{24}O_5N_2$, Schmp. 228°, $[\alpha]_D = + 0{,}13°$, während er den Schmp. der inaktiven Säure zu 243 bis 244° bei gleicher Bruttoformel angibt.

Man sieht, daß die Angaben von *Z. Skraup* über den Wasserstoffgehalt dieser beiden Säuren nach kurzer Zeit schon sehr differierten. Es ist auffällig, bei den Untersuchungen von *Skraup*, daß entgegen allen Erfahrungen der Schmp. der inaktiven Säure um 16° höher angegeben ist als der der aktiven.

Auf eine andere Weise kamen *Emil Fischer* und *Emil Abderhalden*[2]) zu einer Verbindung, die sie aber nicht für identisch halten mit der Caseinsäure von *Skraup*. Die genannten Forscher hydrolysierten Casein mit Schwefelsäure und entfernten die Schwefelsäure in bekannter Weise mit Baryt, engten ein und ließen das Tyrosin auskristallisieren. Dieses enthält schon einen Teil der neuen Verbindung. In der Mutterlauge liegt noch ein weiterer Teil der neuen Verbindung vor. Man kristallisiert die Mutterlaugen weiter und wäscht aus den neu erhaltenen Kristallfraktionen Leucin und Glutaminsäure mit Wasser heraus. Aus der Mutterlauge fällt man mit Phosphorwolframsäure eine neuerliche Menge der neuen Substanz aus.

Man sieht schon, daß hier eine Differenz in den Angaben über die Eigenschaften dieser Aminosäuren besteht, da *Skraups* Caseinsäure mit Phosphorwolframsäure nicht fällbar ist, während *E. Fischer* gerade die Fällung mit Phosphorwolframsäure zur Darstellung benützte.

E. Fischer zerlegte das ausgefällte Phosphorwolframiat in üblicher Weise mit Baryt und engte die barytfreie Lösung bis zur Kristallisation der neuen Säure ein. Sie wurde aus heißem Wasser umgelöst. Die ausgeschiedenen Kristalle wurden in starker Salzsäure aufgelöst, die hierauf ausgeschiedenen Kristalle des Chlorhydrats in warmem Wasser aufgenommen und die freie Säure durch Neutralisation mit Ammoniak gefällt. *E. Fischer* erhielt eine optisch-aktive Säure $[\alpha]_D = - 9°$, welcher Wert ebenfalls von dem von *Skraup* angegebenen differiert.

Die Bruttoformel $C_{12}H_{26}O_5N_2$ differiert ebenfalls von den beiden Angaben über Caseinsäure, da der Wasserstoffwert höher angegeben ist. Der Schmp. der optisch-aktiven Säure von *E. Fischer* ist weitaus höher als der der Caseinsäure, nämlich 255°. Die von ihnen gefundene Säure fassen *E. Fischer* und *Abderhalden* als eine *Trioxydiaminododekansäure* auf, ohne einen Konstitutionsbeweis anzutreten. Sie lassen es unbestimmt, ob hier eine gerade oder verzweigte Kohlenstoffkette vorliegt.

Wir sind bei unseren Untersuchungen auf eine Substanz gestoßen, die vielleicht in Beziehung steht zu den von *Skraup* und *Fischer* beschriebenen Verbindungen, wobei vielleicht anzunehmen ist, daß *Skraup* seine Substanz, nämlich die Caseinsäure, nicht in genügender Reinheit zur Analyse gebracht hat.

---

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 42, 274, 1904.
[2]) Ebendaselbst 42, 540, 1904.



Wir wollen vorerst den Gang der Auffindung schildern:

Wir haben 500 g Casein in 5 Liter 0,5proz. Sodalösung und 2 g Pankreatin 60 Tage lang in Thermostaten bei 37° stehen lassen. Zum Schutze wurde reichlich Toluol und Chloroform in die Lösung eingerührt. Beim Abbrechen des Versuches wurde von einer reichlichen Ausscheidung von Kristallen abfiltriert. In den ausgeschiedenen Kristallen war, wie die späteren Untersuchungen gezeigt haben, die neue Verbindung nicht zu finden. Das Filtrat von der spontan ausgeschiedenen Kristallmasse, welches alkalisch reagierte, wurde nun auf 1 ½ Liter im Wasserstoffstrom und Vakuum eingeengt. Es schied sich eine neue Kristallfraktion ab. Diese Kristalle zeigten sowohl die *Millon*sche als auch die Tryptophanreaktion[1]) schwach. Beim Umkristallisieren sieht man im Mikroskop verschiedene Kristallformen. Diese Kristalle wurden mit 1½ Liter Alkohol kurz aufgekocht. Der Alkohol nimmt die braunrote Farbe auf, läßt aber die Hauptmasse der Kristalle ungelöst, welche man auf einem Dampftrichter abfiltrieren kann. Hierauf löst man sie in 700 ccm siedenden Wassers auf. Beim Einengen kristallisiert die Substanz wieder, ist aber noch immer rosa gefärbt. Sie wird daher wiederum in heißem Wasser gelöst und mit einer ganz kleinen Menge Tierkohle gekocht, filtriert und bis zur Ausscheidung von Kristallen eingeengt. Beim Abkühlen scheidet sich die Hauptmenge aus, die wiederholt umkristallisiert wurde. Nach mehrfachem Umkristallisieren verschwand die früher spurenweise auftretende Tyrosin- und Tryptophanreaktion vollständig und die so gewonnenen Fraktionen, welche den gleichen Schmp. zeigten, wurden vereinigt, und nach nochmaligem Umkristallisieren über Schwefelsäure im Vakuum getrocknet. Die Kristalle waren weiß, unlöslich in Alkohol, unter dem Mikroskop zeigten sie Doppelbrechung und bei gekreuzten Nikols Rosetten und kugelförmige Kristallaggregate. Der Geschmack ist ein wenig bitter. Im *Landolt-Lippich*schen Apparat mit der *Emil Fischer*schen Mikro-Anordnung erwies sich die Substanz als inaktiv, in einer zugeschmolzenen Kapillare schmilzt sie bei 255,4°. Bei 120° verliert sie nichts an Gewicht.

Diese vakuumtrockene Substanz wurde verbrannt und gab folgende Werte:

6,500 mg	Sbst.	12,400 mg	CO_2	5,490 mg	H_2O,
4,905 „	„	9,400 „	CO_2	4,250 „	H_2O,
2,106 „	„	0,190 ccm	N_2	(17°, 738 mm),	
3,449 „	„	0,314 „	N_2	(17°, 738 „).	

Für die Formel $C_{12}H_{26}O_5N_2$:	Ber.	C 51,75,	H 9,42,	N 10,07,
	Gef.	C 52,04,	H 9,45,	N 10,31,
		C 52,28,	H 9,70,	N 10,41.

---

[1]) *Hopkins*, Proc. of the roy. soc. London **68**, 21.



Diese Elementaranalyse stimmt nun überein mit den von *Emil Fischer* und *E. Abderhalden* für ihre Trioxydodecansäure gewonnenen und zeigt Wasserstoffwerte, wie diese und nicht wie die *Skraup*schen Analysen für Caseinsäure.

Um nun zu ermitteln, in welcher Form die zwei Stickstoffatome vorhanden sind, wurde die Aminogruppenbestimmung nach *van Slyke*[1]) vorgenommen und die Formoltitration nach *Sörensen*[2]).

Die Bestimmung nach *van Slyke* ergab:

In Wasser gelöste:

33,920 mg Sbst. geben 7,6 ccm N_2 (23°, 745 mm),
43,250 „ „ „ 9,2 „ N_2 (23°, 745 „).

Ber. für $C_{12}H_{22}O_5(NH_2)_2$ 10,07 N, gef. 12,31 N, gef. 11,61 N.

Man sieht also, daß durch die Einwirkung von salpetriger Säure die Anwesenheit zweier NH_2-Gruppen festgestellt werden kann, daß also der *gesamte Stickstoff* dieser Verbindung in Form von zwei Aminogruppen in ihm enthalten ist.

Das gleiche Resultat zeigt die Formoltitration.

Die nach *Sörensen* bereitete frische Formaldehydlösung wurde mit 19,820 mg Substanz, in Wasser gelöst, vermischt. Bei der Titration wurden verbraucht 1,6 ccm n/10 Lauge, während der für *zwei* Carboxylgruppen berechnete Verbrauch 1,43 ccm betragen sollte.

Hiermit ist der Beweis erbracht, daß nach Aufheben des basischen Charakters der Aminogruppen die zugesetzte Lauge zwei Carboxylgruppen neutralisierte. Es läßt sich also die Formel nach diesen Bestimmungen vorläufig auflösen in $C_{10}H_{20}O(NH_2)_2(COOH)_2$.

Molekulargewichtsbestimmung nach Rast: 0,970 mg Substanz wurden mit 20,380 mg Campher geschmolzen. Depression 8°. Molekulargewicht ber. für $C_{12}H_{26}O_5N_2$ 278, für $C_{12}H_{24}O_4N_2$ 260 gef. 238.

Es lag die Vermutung nun nahe, daß die Substanz, trotzdem sie bei 120° getrocknet war, doch den noch nicht aufgeklärten letzten Sauerstoff in Form von Kristallwasser enthält. Daher wurde die Kristallwasserbestimmung bei einer noch höheren Temperatur vorgenommen.

Kristallwasserbestimmung: 294,240 mg Substanz bei 125 bis 130° 4 Stunden bis zur Konstanz getrocknet, verloren 17,780 mg. Für 1 Mol. H_2O ber. 6,47, gef. 6,01.

Der Schmelzpunkt der nun vom Kristallwasser befreiten Diaminodicarbonsäure beträgt 261,5°.

Da sich durch die Kristallwasserbestimmung herausgestellt hat, daß die Substanz mit einem Molekül Wasser kristallisiert, also nicht fünf Sauerstoffe, sondern nur vier Sauerstoffe enthält, so war es klar, wie es auch aus der Formoltitration hervorgeht, daß sie nur vier

[1]) Journ. of biol. Chem. 9, 185, 1911.

[2]) Diese Zeitschr. 7, 45, 1908.



Sauerstoffe in Form von zwei Carboxylgruppen und keinen anderen Sauerstoff enthält, und daß die früheren Forscher den Kristallwassersauerstoff für einen integrierenden Bestandteil der „Diaminotrioxydodecansäure" bzw. Caseinsäure hielten. Der Beweis, daß es sich um eine Diaminodicarbonsäure handelt, konnte, wie im Späteren gezeigt wird, erbracht werden.

Vorerst ist gezeigt worden, daß auf je eine Carboxylgruppe eine Aminogruppe im Molekül enthalten ist.

Die von Kristallwasser befreite Substanz vom Schmp. 261,5° zeigte folgende Analysenwerte:

3,480 mg	Sbst.	7,035 mg	CO_2	2,915 mg	H_2O,
2,590 „	„	5,277 „	CO_2	2,190 „	H_2O,
3,425 „	„	0,320 ccm	N_2	(17°, 745 mm),	
2,940 „	„	0,275 „	N_2	(17°, 745 „).	

Für die Formel $C_{12}H_{24}O_4N_2$	ber.:	C 55,39,	H 9,30,	N 10,77,
	gef.:	C 55,15,	H 9,37,	N 10,78,
		C 55,58,	H 9,46,	N 10,86.

Die Substanz ist sublimierbar, das Sublimat hat denselben Schmp., wie die vom Kristallwasser befreite Ausgangssubstanz. Bei der Elementaranalyse der sublimierten Substanz erhalten wir folgende Werte:

4,175 mg	Sbst.	8,480 mg	CO_2	3,705 mg	H_2O,
2,266 „	„	4,613 „	CO_2	1,989 „	H_2O,
1,610 „	„	0,147 ccm	N_2	(15°, 745 mm),	
2,060 „	„	0,185 „	N_2	(15°, 745 „).	

Für die Formel $C_{12}H_{24}O_4N_2$	ber.:	C 55,39,	H 9,30,	N 10,77,
	gef.:	C 55,28,	H 9,90,	N 10,61,
		C 55,53,	H 9,82,	N 10,44.

Das Chlorhydrat des Esters der Diaminodicarbonsäure: 0,6 g der Substanz wurden in 5 ccm absolutem Alkohol suspendiert und reines Salzsäuregas unter Kühlung eingeleitet. Die Säure geht in Alkohol in Lösung, nach 3 Stunden wird die Einleitung abgebrochen, die Lösung bei Zimmertemperatur stehen gelassen, dann im Vakuumexsikkator über Kalk und Ätznatron und Schwefelsäure eingeengt. Es bildet sich ein Kristallbrei, welcher auf einer Tonplatte im Vakuum abgesaugt wird. Man nimmt die Kristalle von der Platte ab, löst sie in heißem, absolutem Alkohol und läßt sie wieder auskristallisieren. Die Kristalle zeigen nach wiederholtem Umkristallisieren den Schmp. 120,5°. Die Analyse ergab folgende Werte:

3,987 mg	Sbst.	6,900 mg	CO_2	2,950 mg	H_2O,
2,350 „	„	4,065 „	CO_2	1,819 „	H_2O,
2,960 „	„	0,187 ccm	N_2	(15°, 741 mm),	
1,970 „	„	0,123 „	N_2	(15°, 743 „),	
1,970 „	„	0,97 ccm	n/100 $AgNO_3$,		
2,115 „	„	1,035 „	n/100 $AgNO_3$.		

Berechnet für $C_{16}H_{36}O_5N_2Cl_2$:

ber.:	C 47,18,	H 8,84,	N 6,88,	Cl 17,44,
gef.:	C 47,21,	H 8,26,	N 7,23,	Cl 17,46,
	C 47,19,	H 8,66,	N 7,23,	Cl 17,32.

Kristallwasserbestimmung bei 125° (über den Schmelzpunkt erhitzt): 0,1000 g Sbst. verloren 0,0042 g. Ber. für $C_{16}H_{34}O_4N_2Cl + H_2O$ 4,42, gef. 4,20.

Äthoxylbestimmung: 2,547 mg Sbst. geben 2,930 mg AgJ. Ber. für $C_{12}H_{24}O_2N_2Cl_2(OC_2H_5)_2 + H_2O$ 22,12, gef. 22,03 Proz. OC_2H_5.

Aus dem Chlorhydrat des Esters wurde der freie Ester dargestellt: 0,1 g Substanz wurden mit einem kleinen Überschuß von Silbercarbonat geschüttelt und nach mehrstündigem Stehen vom Silber abfiltriert und das Filtrat eingeengt. Der Ester wurde aus Wasser umkristallisiert. Schmp. 210°.

2,690 mg Sbst. 0,214 ccm N_2 (16°, 743 mm). $C_{16}H_{32}O_4N_2$ ber. N_2 8,86, gef. 9,18.

Molekulargewichtsbestimmung nach Rast: 0,660 mg Sbst. 14,220 mg Campher. Depression 6°. Ber. für $C_{16}H_{32}O_4N_2$ 316, gef. 309.

Die Bruttoformel $C_{12}H_{26}N_2O_5$ der gefundenen Aminosäure, welche vielleicht identisch ist mit der sogenannten Trioxydiaminododekansäure von *E. Fischer* und *E. Abderhalden*, läßt sich daher nach unseren bisherigen Untersuchungen auflösen in: $C_{10}H_{18} \cdot (NH_2)_2 \cdot (COOH)_2 + H_2O$.

Unsere Substanz ist nicht mit Phosphorwolframsäure fällbar. Wir haben also eine Aminosäure gefunden, welche ohne Anwendung komplizierter Methoden, wie sie von *Skraup* und *Emil Fischer* angewandt wurden, erhalten werden konnte, von welcher aber nicht sicher ist, ob sie mit der Caseinsäure oder mit der Trioxydiaminododecansäure identisch ist.

Am wahrscheinlichsten ist es, daß sie mit der letzteren identisch ist, wenngleich mehrfache Differenzen bestehen, so der verschiedene Schmp., die optische Aktivität und die verschiedene Fällbarkeit mit Phosphorwolframsäure.

Die als Caseinsäure bezeichnete Substanz zeigt nach den verschiedenen Forschern folgendes physikalisches Verhalten:

	Schmp.	Drehung	Kristallform
Z. Skraup	228°	+ 0,13°	Prismen in kolbenförmigen
„ „	243—244°	inaktiv	Aggregaten. Undeutlich.
E. Fischer	255°	— 9°	Rosetten, kugelf. Aggregate.
Eigene Beobachtung . . .	255,4°	inaktiv	Wir finden die gleichen Kristallformen wie *E. Fischer* und *E. Abderhalden*.

Wie dem auch immer sein mag, haben wir eine neue Aminosäure aus dem Verdauungsgemisch auf eine höchst einfache Weise isoliert, die sich als Dodecandiaminodicarbonsäure erwies, da sowohl zwei

Aminogruppen als auch zwei Carboxylgruppen in ihr enthalten sind. Der fünfte Sauerstoff, dessen Funktion *E. Fischer* und *E. Abderhalden* als einer Hydroxylgruppe angehörig aufgefaßt haben, erwies sich bei unserer Verbindung als einem Kristallwasser angehörig, welches erst bei höheren Temperaturen abgespalten wird.

Oxyprolin.

Außer dieser Verbindung haben wir noch bei dieser Untersuchung in einer anderen als bisher beschriebenen Art das Oxyprolin darzustellen vermocht.

Während *S. Fränkel* und *Jellinek*[1]) aus der Mutterlauge des Tyrosinanhydrids, nach vorheriger Entfernung des Tryptophananhydrids mit Quecksilbersulfat, Oxyprolin mit Alkohol fällten, haben wir in einfacherer Weise, ohne Quecksilbervorbehandlung, die Mutterlauge der neuen Dodecandiaminodicarbonsäure mit viel Alkohol gefällt und den Niederschlag wiederholt auf der Zentrifuge mit Alkohol gewaschen und dann mit 50proz. Alkohol ausgekocht. Beim Abkühlen der Lösung erhielten wir Oxyprolin Schmp. 270°. Die Analyse ergab folgende Werte:

4,775 mg Sbst.	8,010 mg CO_2	3,143 mg H_2O,		
4,630 „ „	0,440 ccm N_2 (26°, 741 mm).			
Ber. $C_5H_9O_3N$:	C 45,92,	H 6,97,	N 10,76.	
Gef.	C 45,79,	H 7,36,	N 10,66.	

Wir haben auch noch eine weitere Substanz darstellen können, wenn auch die Ausbeute eine so geringe war, daß die weitere Konstitutionsermittlung einer neuen Arbeit vorbehalten bleiben muß. Der Alkohol, mit welchem die rohe Dodecandiaminodicarbonsäure ausgekocht wurde (s. S. 437), wurde sehr stark konzentriert, wobei sich beim Abkühlen ein Niederschlag ausschied. Dieser wurde in wenig Wasser gelöst und mit Alkohol gefällt. Der Schmp. lag bei 266°, die Substanz reagierte schwach sauer, die Elementaranalyse ergab folgende Werte:

2,765 mg Sbst.	4,955 mg CO_2	2,200 mg H_2O,	
4,635 „ „	8,385 „ CO_2	3,680 „ H_2O,	
1,780 „ „	0,202 ccm N_2 (24°, 745 mm),		
2,055 „ „	0,233 „ N_2 (24°, 745 „).		
Ber. $C_9H_{20}O_4N_2$:	C 49,11,	H 9,16,	N 12,72,
Gef.	C 48,89,	H 8,9,	N 12,78,
	C 49,35,	H 9,89,	N 12,76.

Formoltitration: 7,720 mg verbrauchten 3,275 ccm n/100 Lauge. Ber. 20,45, gef. 19,34 für eine Carboxylgruppe.

---

[1]) *S. Fränkel* und *Jellinek*, diese Zeitschr. **130**, 592, 1922.

Über Avitaminose bei Tauben, welche der Großhirnhemisphären beraubt sind.

Von

B. J. Bajandurow.

(Aus dem physiologischen Institut der Staatlichen Universität Tomsk.)

(Eingegangen am 3. Januar 1927.)

Mit 15 Abbildungen im Text.

Die sogenannte Vitaminfrage ist noch bis heute eine der Kernfragen in der Physiologie. Ungeachtet der kollossalen Menge von Forschüngen, welche in der letzten Zeit veröffentlicht sind, bleibt noch sehr vieles ungeklärt.

Für meine Versuche benutzte ich erkrankte Tauben, welche mit geschältem, sterilisiertem Reis gefüttert wurden. Zum ersten Male wurde diese Erkrankung von *Eykmann* (1) experimentell an Vögeln hervorgerufen und von ihm als Polyneuritis gallinarum benannt. Späterhin wurden seine Arbeiten an einem reichlichen Material, hauptsächlich durch *Funk* (2) u. a., geprüft und bestätigt. Die sogenannte „Beriberi" der Vögel wurde von *Funk* an einer großen Anzahl von Tauben erhalten. Die Ursache der Erkrankung ist das Fehlen der Vitamine in der Nahrung. Die Symptome der „Beriberi" bei Tauben offenbaren sich: 1. in progressierendem Sinken des Körpergewichts und 2. in der Entwicklung polyneuritischer Erscheinungen. Die Erkrankung an sich verläuft nicht *mit einem Male*. *Funk* unterscheidet folgende Symptomformen, welche dem Tode der Taube vorhergehen und im Laufe von 12 bis 24 Stunden anhalten: die spastische, die atrophische, die paralytische und die spastisch-paralytische. Auf diese Formen begründete auch ich meine Versuche, außerdem wandte ich das von *Funk* vorgeschlagene Provokationsverfahren zur Frühdiagnose der Erkrankung an (d. h. das „Aufwerfen" der Taube).

In meinen Versuchen nahm ich sowohl diese als auch jene Symptome in Betracht. Allein besonders interessant schien mir das Sinken des Körpergewichts zu sein. In unserem Laboratorium wird unter Leitung von Prof. *Popow* schon im Laufe einiger Jahre die Frage über einige vegetative Funktionen des Nervensystems bei Tauben studiert. Es erwies sich, daß bei Verletzung des Großhirns bei Tauben die Regulation des Körpergewichts scharf gestört wird, wobei als besonders wichtiges Symptom dieser Störung das enorme Steigen des Körpergewichts nach der Operation ins Auge fällt. Ich setzte mir als

Aufgabe, die Frage zu lösen, ob bei Tauben, welche der Großhirnhemisphären verlustig geworden sind, das Körpergewicht ebenso sinke, wie bei normalen Tauben, oder ob irgend ein Unterschied vorhanden sei. Die Versuchsanordnung war folgende: es wurden zwei Tauben von annähernd gleichem Gewicht genommen, dieselben wurden einer bestimmten Diät unterworfen (25 g Weizen und 15 g Wasser pro Tag). Wenn nun das Körpergewicht der Taube auf einer bestimmten Höhe mit relativ kleinen Schwankungen eingestellt war, wurde bei der einen das Großhirn entfernt. Nachdem diese Taube wieder ihr Anfangsgewicht erreicht hatte, wurde sie zugleich mit der anderen auf Reisfütterung übergeführt[1]). Der Zustand des Kropfes wurde pünktlich kontrolliert.

Versuchsbeschreibung.

1. Taube „Bib" wurde am 24. April 1925 in den Käfig gesetzt und bei Zwangsfütterung gehalten[2]). Sie erhält täglich 25 g Weizen und 15 g Wasser. Das Anfangsgewicht 290 g blieb in einer Höhe (Kurve 1), indem es um 285 g schwankt. Am 10. Mai wurden beide Großhirnhemisphären entfernt. Das Gewicht fällt während 24 Stunden scharf bis auf 270 g. Vom 11. Mai an wird sterilisierter Reis (25 g) verabreicht. Das Gewicht steigt stoßweise schnell und erreicht am siebenten Tage sein Maximum (327 g), danach sinkt es allmählich bis auf 300 g. Die Taube kam bei Erscheinungen spastisch-paralytischer Form der Polyneuritis um.

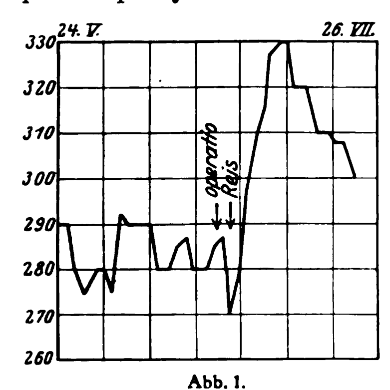


Abb. 1.

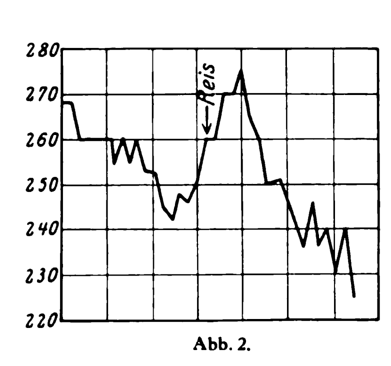


Abb. 2.

2. Kontrolltaube zum „Bib", „Sneshok", wurde am 24. April in den Käfig gesetzt und ebenso wie die erste bei derselben Diät gehalten. Sie wurde auch an demselben Tage, wie die erste, auf Reisfütterung übergeführt. Anfangsgewicht 265 g (Kurve 2). Nach Reisfütterung etliches Steigen, danach treppenförmiges Sinken des Gewichts, welches im Moment der Erkrankung bis auf 225 g fällt. In diesem Falle haben wir das klassische

[1]) 25 g geschälten Reises, im Autoklav bei 2 Atm. Druck im Laufe von 3 Stunden sterilisiert, und 15 g destillierten Wassers pro Tag.

[2]) Um die Identität der Versuchsanordnung nicht zu stören, wurden die Tauben sowohl vor dem Reisregime als auch nach demselben der Zwangsfütterung unterworfen.

Senkungsbild des Körpergewichts. Meine Kurve ist jener, welche *Funk* (2) in seiner Arbeit dargestellt hat, ähnlich. Zum Vergleich führe ich sie als Kurve 3 an. Kurve 1 der „Bib“ mit Kurve 2 der „Sneshok“ vergleichend, finden wir einen wesentlichen Unterschied. Während „Bibs“ Körpergewicht bis zum Tode höher war als vor der Operation, sank das Gewicht der Kontrolltaube beträchtlich.

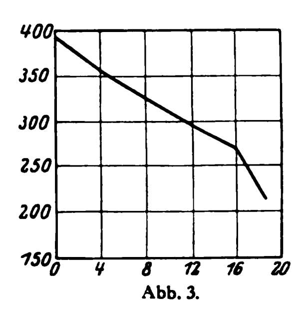


Abb. 3.

3. Taube „Husar“ wurde am 21. Februar in den Käfig gebracht und bei Zwangsfütterung (25 g Weizen und 15 g Wasser) gehalten. Ihr Anfangsgewicht (290 g) war jenem vor der Operation gleich. Am 7. März wurden beide Großhirnhemisphären entfernt. Das Gewicht fällt bis auf 250 g, danach steigt es, und 7 Tage nach der Operation erreicht es seine Anfangshöhe (Kurve 4). Am 15. März wird die Taube auf Reisdiät übergeführt. Das Gewicht fängt an, schnell zu steigen und erreicht sein Maximum (300 g), danach sinkt es etwas und

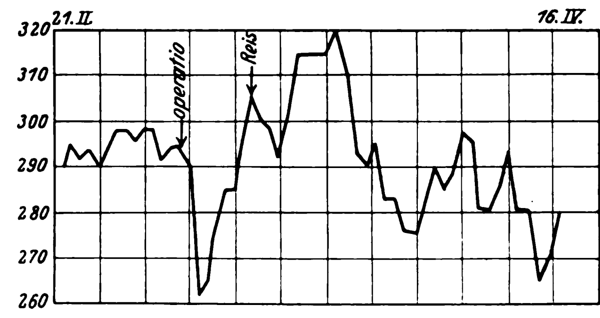


Abb. 4.

hält sich lange in der Höhe, welche es vor der Operation hatte. Im Moment der Erkrankung ist es gleich 280 g, indem im Vergleich zum Anfangsgewicht ein Unterschied von 10 g bemerkt wird.

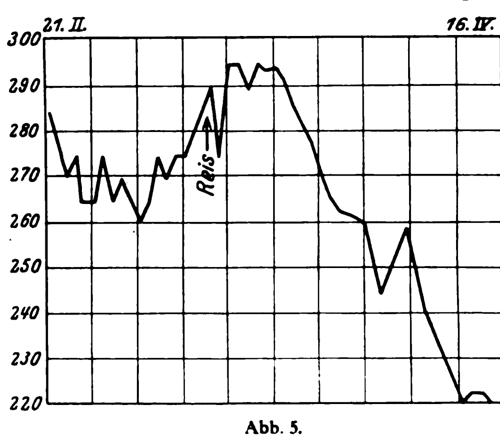


Abb. 5.

4. Kontrolltaube zum „Husaren“, „Sophi“, wurde wie die vorhergehende gehalten. Das Gewicht hielt sich bis zum Moment der Überführung auf Reis in gleicher Höhe (290 g). Nach Anfang der Reisfütterung charakteristisches Fallen des Gewichts. Im Moment der Erkrankung sinkt es bis auf 220 g. In diesem Falle erhielt ich ebenso wie auch beim „Sneshok“ die typische Kurve des Vitaminhungerns. „Sophi“ und „Husar“ kamen gleichzeitig um.

5. Taube „Keth“, am 31. Mai in den Käfig gesetzt, erhält Zwangsnahrung (25 g Weizen und 15 g Wasser). Anfangsgewicht 295 g (Kurve 6). Das Gewicht hält sich fast in gerader Linie mit unbedeutenden Schwankungen. Im Juni wurden beide Großhirnhemisphären entfernt. Das Gewicht fällt bis auf 265 g. Sofort nach der Operation Reisfütterung. Am siebten Tage der Reisfütterung erreicht das Gewicht sein Maximum, welches jenem vor der Operation gleicht, alsdann wird wieder ein Sinken und nachdem ein Steigen des Gewichts beobachtet. Im Moment des Todes war das Gewicht nur um 10 g niedriger als jenes vor der Operation. Die Taube verendete am 14. Tage mit Polyneuritiserscheinungen.

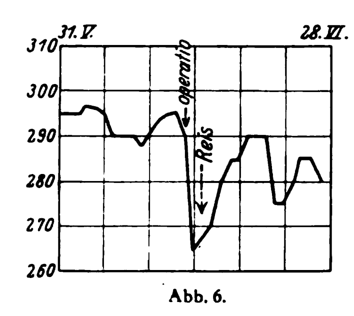


Abb. 6.

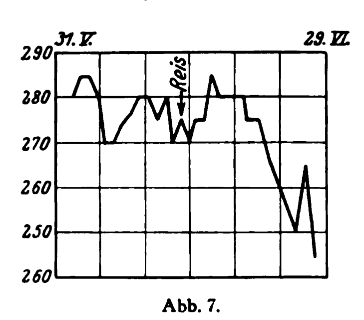


Abb. 7.

6. Taube „Don“, Kontrolle zur „Keth“, wurde ebenso wie die vorhergehende gehalten. Das Anfangsgewicht war 280 g (Kurve 7). Vor der Reisdiät hielt sich das Gewicht in einer Höhe, indem es geringe Schwankungen auf- und abwärts zeigte. Vom Moment der Überführung auf Reis angefangen, fällt das Gewicht schnell und weist im Moment der Erkrankung die Ziffer 245 g auf. Die Taube verendete am 16. Tage mit Erscheinungen spastisch-paralytischer Form der Polyneuritis, wobei sie 35 g an Gewicht verloren hatte.

7. Taube „Lastotschka“ wurde am 23. Februar 1926 bei demselben Regime in den Käfig gesperrt. Anfangsgewicht war 290 g. Das Gewicht

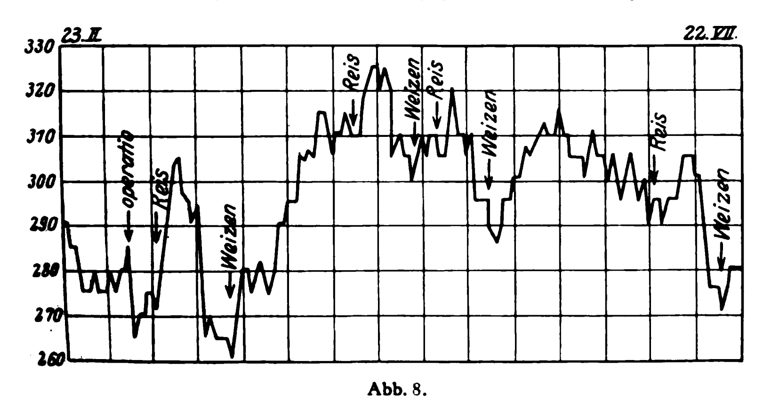


Abb. 8.

vor der Operation schwankte zwischen 280 und 275 g (Kurve 8). Im Moment der Operation war das Gewicht gleich 285 g. Am 9. März wurden beide

Großhirnhemisphären entfernt. Das Gewicht fällt bis auf 265 g. Am neunten Tage erreicht es seine Anfangshöhe, wonach die Taube auf Reisdiät übergeführt wird. Nachdem steigt das Gewicht und erreicht sein Maximum (305 g). Danach schwankt das Gewicht etwa in Normalgrenzen, mit einem Male fällt es schnell, zugleich treten die ersten Erkrankungssymptome auf: leichte Krämpfe, ataktischer Gang, beim Aufwerfen fliegt die Taube mit wachsender Schnelligkeit kräftig vorwärts und stößt sich an unterwegs vorkommende Gegenstände. Erbrechen. Im Moment der Erkrankung war das Gewicht gleich 265 g. Bei dieser Taube wurde die Behandlung der Krankheit angewandt, welche in der Überführung zur früheren Diät (Weizen) bestand. Am fünften Tage der Behandlung erreichte die Taube ihr Anfangsgewicht, und am 23. Tage wog sie 315 g. Vom Anfang der Reisfütterung bis zum Moment der Erkrankung vergingen 11 Tage. 5 Tage nach Anwendung der Behandlung wurde die Taube wieder auf Reisfütterung übergeführt, das Körpergewicht war zu dieser Zeit gleich 310 g. Die Erkrankung trat am 14. Tage ein. Im Moment der Erkrankung fiel das Gewicht bis auf 300 g. Der Verlust an Körpergewicht machte 10 g aus im Vergleich zum Gewicht vor der zweiten Reisgabe. Bezüglich des Gewichts vor der Operation hat die Taube nicht nur nicht abgenommen, sondern sogar 20 g zugenommen. 5 Tage nach der Erkrankung wurde die Taube wieder auf Reis übergeführt. Zu dieser Zeit wog sie 310 g. Die Erkrankung trat am 12. Tage ein. Das Gewicht fiel bis auf 295 g. Die Taube verlor an Gewicht im Moment der dritten Erkrankung 15 g im Vergleich zum Gewicht vor der dritten Reisgabe, dennoch war dieses Gewicht um 15 g höher als vor der Operation. Nach Anwendung der Behandlung erholte sich die Taube und erreichte ihr Anfangsgewicht am 12. Tage. Danach fängt das Gewicht der Taube an, treppenförmig zu sinken, und bei 290 g wird sie wiederum auf Reis gesetzt. Die Erkrankung trat am 16. Tage ein. Zu dieser Zeit fiel das Gewicht bis auf 270 g. Die Taube verlor diesmal an Gewicht 20 g, im Vergleich aber zum Gewicht vor der Operation nur 10 g. Nach Anwendung des Heilverfahrens hielt sich das Gewicht lange Zeit auf niedrigen Ziffern. Die Taube wurde am 135. Tage nach der Operation getötet.

8. Taube „Laska", Kontrolle zur „Lastotschka", wurde zu gleicher Zeit mit der vorhergehenden bei gleicher Kost in den Käfig gesperrt. Anfangsgewicht 285 g. Vor dem Anfang der Reisfütterung schwankte das Gewicht zwischen 290 und 275 g. Im Moment der Überführung auf Reisfutter machte das Gewicht 285 g aus. Nachdem schnelles Fallen des Gewichts, Aufstieg bis zum Anfangsgewicht und wiederum Fallen bis auf 240 g. Während bei der vorhergehenden Taube sich ein volles Bild der Polyneuritis entwickelte, bemerkte man bei der „Laska" durchaus keine Anzeichen, sogar bei Provokation, welche im Aufwerfen bestand. Diese Taube wurde zu gleicher Zeit mit „Lastotschka" auf Weizen übergeführt. Das Gewicht der Taube fing an, langsam treppenförmig zu steigen, und erreichte ihr Anfangsgewicht erst am 28. Tage, wonach sie zum zweiten Male auf Reiskost übergeführt wurde (Kurve 9), wiederum gleichzeitig mit der vorhergehenden Taube. Zu dieser Zeit wog sie 280 g. Während bei der dezerebrierten Taube schon am 14. Tage des Reisregimes ein volles Bild der Erkrankung erhalten wurde, konnte bei der Kontrolltaube „Laska" an diesem Tage nichts bemerkt werden, was auf Erkrankung hindeutete, obgleich das Gewicht der Taube bis auf 245 g gesunken war. Folglich verlor die Taube in dieser Zeitspanne 35 g an Gewicht. Nach Überführung

auf Weizen erreichte die Taube ihr Anfangsgewicht (280 g) am vierten Tage. Nachdem wurde sie zum dritten Male auf Reis übergeführt, gleichfalls zusammen mit „Lastotschka". Diesmal wurde die Beobachtung bis zum Auftreten der Erkrankung geführt, welche am 15. Tage eintrat, während „Lastotschka" am zehnten Tage erkrankte. Zu diesem Moment fiel das Gewicht bis auf 225 g. Im ganzen verlor die Taube 55 g an Gewicht. Ungeachtet der angewandten Heilmethode gelang es nicht, das Gewicht bis auf die frühere Höhe zu bringen. Am 33. Tage der Weizenkost wurde die Taube zum vierten Male auf Reiskost übergeführt. In diesem Moment wog die Taube 265 g. Die Erkrankung trat am 19. Tage ein. Das Gewicht fiel bis auf 220 g. Die Taube verlor an Gewicht 45 g.

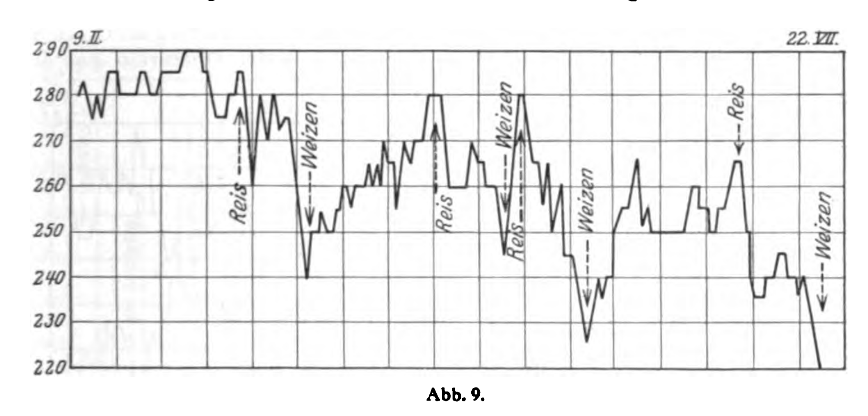


Abb. 9.

9. Taube „Alpha" wurde am 17. Juli 1926 bei gleicher Kost in den Käfig gesetzt. Das Gewicht vor der Operation schwankte zwischen 248 und 251 g. Die Operation wurde in üblicher Weise ausgeführt. Am achten Tage nach der Operation erreichte das Gewicht seine Anfangshöhe. Die Taube wurde auf Reiskost übergeführt. Die Erkrankung an Polyneuritis erfolgte am 19. Tage. Das Gewicht fiel im Moment der Erkrankung bis auf 245 g. Die Taube hatte nur 6 g verloren. Nach Anwendung des Heilverfahrens erreichte die Taube ihr Anfangsgewicht am zweiten Tage der Behandlung (Kurve 10). 11 Tage nach der ersten Erkrankung wurde die Taube zum zweiten Male auf Reis übergeführt. Hierbei wog sie 265 g. Die zweite Erkrankung trat am zehnten Tage ein. Das Gewicht fiel bis auf 250 g. Gewichtsunterschied = 15 g. Die Behandlung hob das Gewicht nicht. Die Taube wurde getötet.

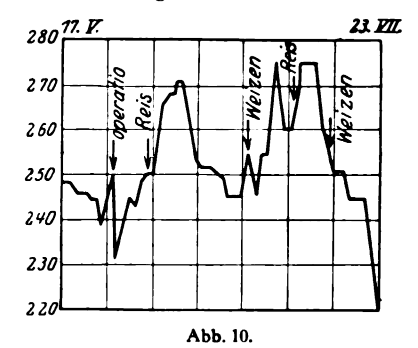


Abb. 10.

10. Taube „Beta" wurde ebenso gehalten wie die vorige. Die Operation wurde an ihr auf übliche Weise gleichzeitig mit der „Alpha" vollzogen. Sie wog vor der Operation 285 g. Am achten Tage, als sie wieder das Anfangsgewicht erreicht hatte, wurde sie auf Reis übergeführt. Erscheinungen

von Polyneuritis traten am 14. Tage ein und endeten letal. Im Moment der Erkrankung war das Gewicht bis auf 270 g gefallen (Kurve 11). Die Taube hat 15 g an Gewicht verloren.

11. Taube „Gamma", Regime dasselbe. Das Gewicht vor der Operation war 280 g. Am siebenten Tage nach der Operation erreichte das Gewicht die Anfangshöhe. Einschaltung der Reisfütterung. Die Erkrankung trat am 17. Tage ein. Das Gewicht im Moment der Erkrankung war gleich 307 g (Kurve 12). Die Taube hat sogar an Gewicht 27 g zugenommen. Am 13. Tage nach der Erkrankung wurde sie zum zweiten Male auf Reis übergeführt. Zu dieser Zeit wog sie 340 g. Die Erkrankung trat am 13. Tage ein. Im Moment der zweiten Erkrankung war das Gewicht 315 g. Im Vergleich zum Anfang der zweiten Reisfütterung hat die Taube 25 g an Gewicht verloren, dagegen im Vergleich zum Gewicht vor der Operation hat sie 35 g zugenommen. Während der Behandlung hielt sich das Gewicht auf niedrigen Zahlen. Die Taube wurde getötet.

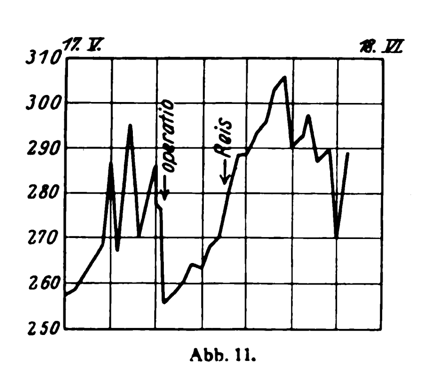


Abb. 11.

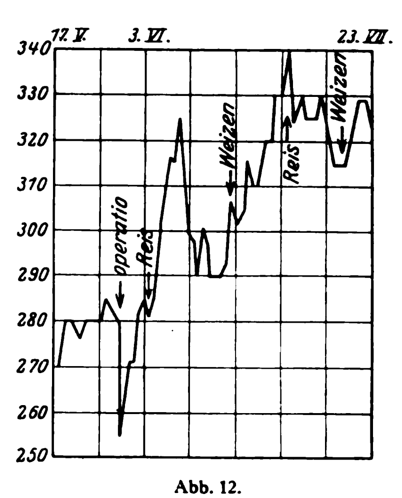


Abb. 12.

12. Taube „Delta". Übliches Regime und Operation. Vor der Operation wog sie 270 g. 7 Tage nach der Operation, als das Anfangsgewicht erreicht war, wurde sie auf Reis übergeführt. Die Erkrankung trat am 17. Tage ein. Hierbei wog die Taube 268 g. Sie hatte nur 2 g an Gewicht verloren. Am 14. Tage nach Anwendung des Heilverfahrens hob sich das Gewicht bis auf 290 g. Alsdann wurde sie auf Reis übergeführt. Am elften Tage trat die Erkrankung ein. Das Gewicht war dabei bis auf 270 g gefallen. Die Taube hat also 20 g an Gewicht im Vergleich zu jenem verloren, welches im Moment des Anfangs der zweiten Reisfütterung vorhanden war. Im Vergleich aber zum Gewicht vor der Operation hat sie nichts verloren. Während der Heilung schwankte das Gewicht an niederen Zahlen (Kurve 13). Die Taube wurde getötet.

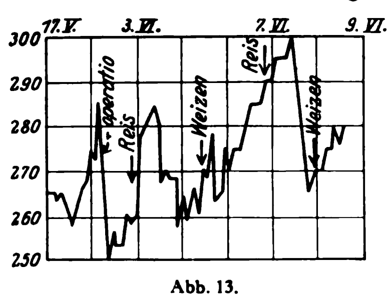


Abb. 13.

13. Taube „Omega" wurde in üblicher Weise vorbereitet. Das Gewicht vor der Operation war 283 g. Am siebten Tage, als das Anfangsgewicht erreicht war, wurde sie auf Reis gebracht. Erscheinungen der Polyneuritis traten am zwölften Tage ein. Hierbei wog die Taube 305 g (Kurve 14). Die Taube hatte an Gewicht 22 g zugenommen. Am 18. Tage der Heilung wurde sie wiederum bei einem Gewicht von 320 g auf Reis übergeführt. Als wieder Erkrankung eintrat, wog die Taube 270 g. Im Vergleich zum Gewicht am Anfang der zweiten Reisfütterung wog die Taube um 50 g weniger, im Vergleich aber zum Anfangsgewicht nur um 13 g. Während der Heilung blieb das Gewicht niedrig. Die Taube wurde getötet.

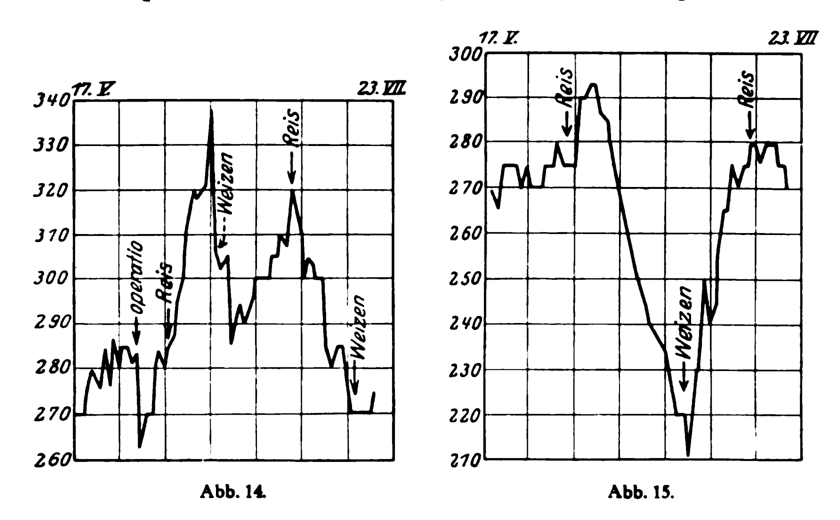


Abb. 14. Abb. 15.

14. Taube „Tedy", Kontrolltaube zu den dezerebrierten Tauben „Alpha", „Beta", „Gamma", „Delta" und „Omega". Sie wurde ebenso wie die dezerebrierten auf Diät gesetzt. Das Gewicht während der Einschaltung der Reisfütterung war 275 g. Das Reisregime fing zu gleicher Zeit mit den dezerebrierten an. Die Erkrankung verlief typisch, Erscheinungen der Polyneuritis traten am 24. Tage ein. Das Gewicht am Anfang der Erkrankung war 210 g (Kurve 15). Die Taube verlor 65 g an Gewicht. Nach Anwendung der Kurkost erholte sich die Taube und erreichte ihr Anfangsgewicht am 14. Tage.

Wenn wir uns zur *Betrachtung der beiliegenden Tabelle* wenden, so werden wir auf den scharfen Unterschied zwischen dem Verhalten und der Beziehung zur Erkrankung dezerebrierter und normaler Tauben aufmerksam. Aus der Tabelle ist ersichtlich, daß das Gewicht der dezerebrierten Tauben im Moment der Erkrankung und demjenigen des Todes sehr unbedeutend fällt. In einigen Fällen ist das Gewicht im Moment der Erkrankung sogar höher als vor der Operation. Bei normalen Tauben, welche in diesem Falle als Kontrolle für die dezerebrierten dienten, war das Fallen des Gewichts immer scharf ausgedrückt. Was nun den Verlauf des Experiments betrifft, so waren in

Nr.	Name der Taube	Gewicht vor der Operation g	Gewicht im Moment der ersten Erkrankung g	Gewichtsunterschied g	Tag der Erkrankung oder des Anfangs der Behandlung	Tag der Erreichung des früheren Gewichts	Gew. zu Anfang der zweiten Reisfütterung g	Gewicht im Moment der zweit. Erkrankung g	Gewichtsunterschied g	Tag der Erkrankung oder des Anfangs der Behandlung	Gewicht zu Anfang der dritten Reisfütterung g	Gewicht im Moment der dritten Erkrankung g	Gewichtsunterschied g	Tag der Erkrankung oder des Anfangs der Behandlung	Gewicht im Moment der vierten Erkrankung g	Gewichtsunterschied g	Tag der Erkrankung	Anmerkungen
1	„Bib“	290	300	+ 10	16	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	Verendete
2	„Sneshok“ Kontrolltaube	270	225	— 45	17	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	„
3	„Husar“	290	280	— 10	32	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	„
4	„Sophi“ Kontrolltaube	290	220	— 70	32	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	„
5	„Keth“	290	280	— 10	14	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	„
6	„Don“ Kontrolltaube	280	245	— 35	16	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	„
7	„Lastotschka“	280	265	— 15	11	5	310	300	— 10 / + 20	14	310	295	— 15	12	270	— 20 / — 10	16	
8	„Laska“ Kontrolltaube	285	240	— 45	—	29	280	245	— 35	—	280	225	— 55	15	220	— 45	19	
9	„Alpha“	251	245	— 6	19	2	265	250	— 15	—	—	—	—	—	—	—	—	
10	„Beta“	285	270	— 15	14	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
11	„Gamma“	280	307	+ 27	17	—	340	315	— 25 / + 35	—	—	—	—	—	—	—	—	
12	„Delta“	270	268	— 2	17	—	290	270	— 20	—	—	—	—	—	—	—	—	
13	„Omega“	283	305	+ 22	12	—	320	270	— 50 / — 13	—	—	—	—	—	—	—	—	
14	„Tedy“ Kontrolltaube	275	210	— 65	24	14	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	

\+ vor der Ziffer bedeutet Gewichtszunahme, — Gewichtsverlust.

Um gleichzeitig die Reisfütterung einzuschalten, wurde die Kontrolltaube nicht bis zur Polyneuritis gebracht, daher ist in der Reihe der Anfangstag der Behandlung bezeichnet.

Die obere Ziffer bedeutet den Gewichtsunterschied zwischen Anfang und Ende der Reisfütterung.

Die untere Ziffer bedeutet den Gewichtsunterschied zwischen jenem vor der Operation und zum Moment der Erkrankung.

der ersten Woche überhaupt keine sichtbaren Störungen zu bemerken, am Ende der zweiten Woche aber bemerkte man dyspeptische Erscheinungen. Sowohl die normalen als auch die dezerebrierten Tauben fingen an, den Reis 1 oder 2 Stunden nach der Fütterung zu erbrechen. Da ich nun für diesen Fall im Käfig einen besonders eingerichteten Boden hatte, so gelang es mir, den erbrochenen Reis genau zu verzeichnen. Das Erbrechen fing gewöhnlich von 5 g an und wuchs bis zu 15 g. Es ist interessant zu bemerken, daß die Menge des erbrochenen Reises bei dezerebrierten Tauben stets größer war als bei normalen.

Somit unterscheiden sich die Symptome der Avitaminose bei dezerebrierten Tauben wesentlich von solchen bei normalen. Die bei den letzteren so charakteristische Gewichtssenkung ist bei dezerebrierten zweifellos schwächer, in einigen Fällen ist sie sogar gar nicht ausgedrückt. Freilich sind auch Ausnahmen möglich. In einem Falle beobachtete ich ein scharfes Fallen des Gewichts bei einer dezerebrierten Taube, welche auf avitaminöser Kost gehalten wurde. Aus Gründen, die nicht von mir abhängen, habe ich ihn hier nicht besprochen. Allein dieser Fall widerspricht durchaus nicht meiner Anschauung. In den schon erwähnten Arbeiten von *Popow* (3) und *Popow* und *Bajandurow* (4) ist das Phänomen der wellenförmigen Schwankungen des Gewichts der Taube nach Entfernung des Großhirns festgestellt worden. Daselbst ist die Voraussetzung gemacht worden, daß die genannten Schwankungen infolge der Funktionsstörungen jener Mechanismen, welche das Körpergewicht regulieren, entstehen. Besonders charakteristische Phasen der Gewichtsschwankung sind dessen Größerwerden in der ersten Zeit nach der Operation. Allein hier wird auch manchmal ausnahmsweise ein Sinken beobachtet. Die Verfasser äußerten die Meinung, daß die Gewichtsregulation mit Teilnahme des Großhirns vor sich gehe. Vom genannten Standpunkt aus können die in dieser Arbeit vorgeführten Tatsachen erklärt werden. In der Tat, wenn wir die Großhirnhemisphären entfernen, stören wir dadurch die Gewichtsregulation. Da nun die Gewichtsregulation gestört ist, fällt das Gewicht bei Avitaminose nicht typisch. Hieraus kann man schließen, daß der Gewichtsverlust an sich bei Avitaminose nicht ausschließlich von Prozessen abhängig ist, welche in peripherischen Zellen vor sich gehen, sondern auch von Eingriffen zentraler Nervenmechanismen. Eine andere Tatsache, welche hier betont werden muß, ist die, daß Polyneuritis bei dezerebrierten Tauben früher eintritt als bei normalen. Dieser Umstand fiel besonders bei Heilungsversuchen normaler und dezerebrierter Tauben ins Auge. Letztere erkranken an Polyneuritis dann, wenn die normalen Tauben äußerlich noch ganz gesund sind, nur aber ihr Gewicht stark gesunken ist. Durch das Heilverfahren wird nicht nur die Erkrankung der dezerebrierten Taube beseitigt,

sondern auch schnell das Gewicht gehoben. Die normale Taube aber, deren Krankheit nur im Sinken des Gewichts ausgedrückt war, kann dasselbe nur sehr langsam zurückerhalten. Wenn die normale Taube zur Polyneuritis gebracht wurde, so verläuft die Heilung noch länger. Wiederholte Anwendung der avitaminösen Kost, welche mit Kurkost abgewechselt wird, erzielt dasselbe Bild. Übrigens fängt nach einer gewissen Zeit solcher Abwechslungen das Gewicht der dezerebrierten Taube an abzunehmen. Wenn über die Teilnahme der Zentralmechanismen geredet werden soll, so richtet sich diese Teilnahme im Endschluß nicht zuungunsten des Organismus. Natürlich sind auf diesem so verwirrten Gebiet nur Voraussetzungen möglich. Neue Versuche in dieser Hinsicht sind überaus notwendig. Die weitere Ausarbeitung dieser Frage soll meine nächste Aufgabe sein.

Auf Grund der oben beschriebenen Tatsachen erlaube ich mir, einige *Schlußfolgerungen* zu äußern:

1. Dezerebrierte Tauben, welche auf Reisdiät gebracht sind, verlieren an Gewicht viel weniger als normale, welche demselben Regime unterworfen wurden, oder sie verlieren garnichts.

2. Die Periode vor der Erkrankung an Polyneuritis ist bei Tauben, welche des Großhirns verlustig geworden sind, gewöhnlich kürzer als bei normalen.

3. Gewöhnlich erholen sich dezerebrierte Tauben nach Anwendung des Heilverfahrens schneller als normale.

4. Der Verlust an Körpergewicht bei Avitaminose verläuft augenscheinlich nicht ohne Teilnahme des Zentralnervensystems.

Zum Schluß halte ich es für meine Pflicht, meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Prof. *Nikolai Popow*, für das von ihm vorgeschlagene Thema und die beständige warme Teilnahme in Rat und Tat bei der Ausführung dieser Arbeit meine innigste Dankbarkeit auszudrücken.

Literatur.

1) *Eykmann*, Virchows Arch. f. pathol. Anat. u. Physiol. **148**, 1897. — 2) *C. Funk*, „Die Vitamine", 1922. — 3) *N. A. Popow*, Shurnal teoretitschesky i praktitschesky Mediziny, T. I, Nr. 3/4, 1923. — 4) *Popow* und *Bajandurow*, ebendaselbst, T. I, Nr. 3/4, 1925.

Zur Blutzuckerfrage.
Fraktionierung der reduzierenden Substanzen in Blutfiltraten.

Von

B. Sjollema.

(Aus dem Laboratorium für medizinische Veterinärchemie der Reichsuniversität Utrecht.)

(Eingegangen am 3. Januar 1927.)

Die Frage, inwiefern die Reduktion von Cuprisalzen und vom Rotblutlaugensalz in Blutfiltraten von Glucose verursacht wird, läßt sich jetzt noch nicht beantworten. Wir wissen nicht, ob neben Nichtzucker — wie Harnsäure, Kreatinin usw. — auch andere Zuckerarten als Glucose im Blute vorkommen.

Es war bis jetzt nicht möglich, in Flüssigkeiten, die nur etwa 0,1 Prom. von verschiedenen Zuckerarten enthalten, eine Trennung hervorzurufen bzw. die Zuckerarten nebeneinander zu bestimmen. Dadurch konnte die Frage, ob verschiedene physiologische und pathologische Verhältnisse, wie Nahrungsaufnahme, Fasten, Diabetes, Injektion von Insulin usw., den Gehalt an jeder der reduzierenden Kohlenhydrate für sich ändern, noch nicht studiert werden.

In dieser Mitteilung wird eine Methode angegeben, welche es ermöglicht, Glucose von Disacchariden (Lactose und Maltose) zu trennen und für sich zu bestimmen. Sie beruht darauf, daß die von der Kohle adsorbierten Zuckerarten ungleich leicht durch oberflächenaktive Stoffe freigegeben werden. Die reduzierenden Stoffe der Blutfiltrate kann man dadurch in drei Fraktionen trennen. Durch Schütteln von Zuckerlösungen bzw. von Blutfiltraten mit Kohle (Carbo animale pro uso int. *Merck* oder Carbo medicinalis *Merck*), nachdem ein wenig Essigsäure zugesetzt ist, bleibt Glucose in Lösung, die Disaccharide bleiben aber, wenn es sich, wie in Blutfiltraten, um sehr verdünnte Lösungen handelt, beinahe vollständig adsorbiert.

Setzt man statt Essigsäure Äther zur Lösung und schüttelt dann mit Kohle, so bleiben die Disaccharide in Lösung.

Bei der Untersuchung von Blutfiltraten findet man deutliche Differenzen, wenn sie entweder mit Kohle plus Essigsäure oder mit

Kohle und Äther behandelt werden. Auch bleiben nach der Behandlung mit Kohle plus Äther noch immer reduzierende Stoffe an Kohle gebunden, d. h. die ursprüngliche Reduktion des Blutfiltrats ist größer als die des Kohle-Ätherfiltrats.

Es ist wohl ausgeschlossen, daß die zweite und dritte Fraktion nur aus dem bekannten reduzierenden Nichtzucker des Blutfiltrats bestehen, dazu sind sie zu groß.

Bei der Trennung mit Kohle und oberflächenaktiven Stoffen muß daran gedacht werden, daß letztere sich in Kohle anhäufen. Die Konzentration dieser Stoffe in der Kohle hängt nach dem Schütteln also nicht nur von ihrem Gehalt in der Lösung ab, sondern auch vom Verhältnis zwischen Volumen der Lösung und Gewicht der Kohle. Man darf darum auch die Menge der Kohle nicht willkürlich ändern. Nachdem verschiedene Verhältnisse geprüft waren, wurden endlich für unsere Zwecke folgende Quantitäten als zweckmäßig gefunden. Zu 50 ccm der Zuckerlösung [bzw. des Blutfiltrats[1])] werden 0,25 ccm Eisessig (also 0,5 Proz.), 2,5 g Kohle gesetzt, dann und wann geschüttelt und nach einer halben Stunde abgesaugt (z. B. im Goochtiegel; der hierzu benutzte Asbest muß gut gewaschen werden) und die Kohle langsam mit $\frac{1}{2}$proz. Essigsäure nachgewaschen bis Filtrat und Waschflüssigkeit zusammen 100 ccm betragen.

Zur Lösung der Disaccharide werden gleichfalls 50 ccm der Lösung und 2,5 g Kohle verwendet.

Es werden hier 15 ccm Äther hinzugesetzt und sofort kräftig geschüttelt; dann und wann wird das Schütteln wiederholt und nach einer halben Stunde abgesaugt und jetzt mit Wasser, das mit Äther gesättigt ist, langsam nachgewaschen, bis das ganze 100 ccm beträgt. Die 15 ccm Äther werden vollständig (oder nahezu vollständig) von der Kohle adsorbiert. Der Äther wird vor der Benutzung drei- oder viermal mit Wasser geschüttelt.

Es muß zur Berechnung des Reduktionsvermögens des Kohle-Ätherfiltrats immer ein Blindversuch mit Wasser, Äther und Kohle gemacht werden; das Resultat dieses Versuchs fällt immer ein wenig niedriger aus als das vom Blindversuch mit Wasser.

Man kann die Größe der zweiten Fraktion auch in der Weise bestimmen, daß die mit verdünnter Essigsäure behandelte Kohle mit einem Gemisch von 50 ccm Wasser und 15 ccm Äther geschüttelt und nach einer halben Stunde abgesaugt wird.

Die untenstehenden Resultate sind alle dadurch erhalten, daß für beide Fraktionen je 50 ccm der Zuckerlösung (bzw. des Blutfiltrats)

[1]) Wo Mangel an Material besteht, können die Analysen mit 25 ccm gemacht werden. Es muß dann von Kohle, Essigsäure und Äther die Hälfte genommen und mit Waschflüssigkeit auf 50 ccm gebracht werden.



verwendet wurden. Das Reduktionsvermögen der Flüssigkeiten wurde stets mit Rotblutlaugensalz in der von *Hagedorn* und *Jensen* angegebenen Weise bestimmt[1]).

Die Blutfiltrate wurden mit wolframsaurem Natrium und verdünnter Schwefelsäure nach *Folin* und *Wu* also 1 : 10 gewonnen[2]). Viele dieser Filtrate sind mit der Biuretreaktion und mit Sulfosalicylsäure untersucht. Das Resultat war immer negativ. Die Blutfiltrate enthielten also keinen an Eiweiß gebundenen Zucker[3]).

Für die Bestimmung nach *Hagedorn* und *Jensen* wurden, je nachdem die Lösung mehr oder weniger arm an Zucker war, meistens 2 oder 5 ccm, oder auch wohl ein anderes Volumen benutzt. Immer wurde das Volumen, bevor es mit der Blutlaugensalzlösung versetzt wurde, auf 10 ccm gebracht. Wo Essigsäure verwendet war, mußte natürlich neutralisiert werden. Die Neutralisation wurde in einer besonderen Portion vorgenommen, damit die Flüssigkeit, welche weiter untersucht wurde, keinen Indikator enthielt.

Nach Zusatz von 1 ccm der Sodalösung und 2 ccm der Rotblutlaugensalzlösung, wurde 15 Minuten im kochenden Wasserbad erhitzt und nach Abkühlung mit Wasser in der üblichen Weise titriert, wobei Natriumthiosulfat von n/200 und eine Mikrobürette verwendet wurden. Diese Thiolösung wurde täglich frisch aus einer n/10 Lösung dargestellt. Nach der Titration wurde immer dadurch geprüft, ob eventuell zu viel Thio verwendet war, daß die titrierte Flüssigkeit mit einer kleinen Spur der Ferricyankaliumlösung versetzt wurde. Es muß dabei wieder eine blaue Farbe auftreten.

Die Menge der Zuckerlösungen oder der Blutfiltrate, welche zur Untersuchung gelangte, enthielt oft etwa 0,5 mg Glucose (bzw. Lactose oder Maltose); es wurden dabei etwa 2,8 ccm der n/200 Thiolösung verbraucht.

Für den Blindversuch (mit 2 ccm der Rotblutlaugensalzlösung) war der Verbrauch an Thiolösung zwischen 3,9 und 4 ccm. Dieser Blindversuch wurde täglich gemacht.

Die Fehlergrenze darf in den meisten Analysen wohl auf mindestens 4 Proz. angenommen werden und kann da, wo die Lösung sehr wenig Zucker enthielt, wohl etwas größer sein.

Resultate.

Einige Male wurden 50 ccm von einer 0,1 prom. Glucoselösung in der oben angegebenen Weise mit Essigsäure und Kohle behandelt und zu gleicher Zeit in der ursprünglichen Lösung eine Bestimmung nach *Hagedorn* und *Jensen* gemacht.

---

[1]) Diese Zeitschr. **135**, 46, 1923.

[2]) Journ. biol. Chem. **41**, 372, 1920; geändert nach *Haden*, ebendaselbst **56**, 469, 1923.

[3]) Mit physiol. NaCl-Lösung dialysiertem Blutplasma (Pferd, verdünnt) 1 : 3500 gibt Sulfosalicylsäure noch eine deutliche Trübung.



Die Glucose wurde dabei immer vollständig zurückgefunden. Dies war auch der Fall, wo eine stärkere Lösung, und zwar von 0,25 Prom. zur Verwendung kam. Es gingen keine reduzierenden Substanzen aus der Kohle in Lösung.

Bevor die richtigen Mengenverhältnisse gefunden waren, wurde die Glucose nicht immer vollständig wiedergefunden. Wo z. B. 5 g Kohle, 1 Proz. Essigsäure genommen wurde und bis auf 80 ccm ausgewaschen wurde, enthielt die Lösung nur 62 mg von den 100 mg Glucose. Durch weiteres Auswaschen mit Essigsäure von 1 Proz. ging die Glucose vollständig in Lösung.

Es mußte natürlich untersucht werden, ob Glucose, die zu Blut zugesetzt war, in der soeben beschriebenen Weise zurückgefunden wird. Pro 100 ccm Pferdeblut wurden einige Male 100 mg Glucose hinzugesetzt und ein Filtrat nach *Folin* und *Wu* gemacht. Der Vergleich der Bestimmung in den Kohle-Essigsäurefiltraten mit und ohne Glucosezusatz zeigte, daß alle Glucose in Lösung geblieben war. Wurden Lactoselösungen von 0,1 Prom. genau derselben Behandlung unterworfen, so blieben wenigstens 90 Proz. der Lactose in der Kohle zurück.

Bei der Feststellung des Reduktionsvermögens von Lactose, Rotblutlaugensalz gegenüber, zeigte sich, daß, wenn dasselbe von Glucose auf 100 ccm gestellt wird, die Zahl für Lactose etwa 72 ist. Weil die zweite Fraktion der Blutfiltrate (d. h. die Fraktion, in welcher sich die Disaccharide befinden) immer weniger als 0,1 Prom. Lactose enthält, wurden auch Lactoselösungen von 0,075 Prom., 0,050 Prom. und 0,025 Prom. untersucht.

Es stellte sich hierbei heraus, daß nur unbedeutende Mengen der Lactose in Lösung blieben, und zwar zwischen 5 und 2 Proz. der ursprünglich anwesenden Lactose. Weil die Blutfiltrate gewöhnlich nicht mehr als 0,030 Prom. von anderen Kohlenhydrate wie Glucose enthält, macht man nach dieser Methode einen unbedeutenden Fehler. Bei der Analyse von Mischungen von Glucose und Lactose läßt sich aus der Differenz zwischen dem Reduktionsvermögen der beiden Filtrate berechnen, wieviel Lactose im Kohle-Essigsäurefiltrat gelöst sein muß.

Es liegt auf der Hand, daß auch eine Mischung von Glucose und Lactose untersucht wurde, und zwar wurde eine 0,1 prom. Glucoselösung mit dem gleichen Volumen einer 0,1 prom. Lactoselösung versetzt. Das Kohle-Essigsäurefiltrat enthielt 52,7 mg Glucose, also ein wenig mehr als theoretisch; unsere Zahlen für Glucose waren aber oft etwas höher als 100. Von Lactose, die in Blut gelöst worden war — 100 mg auf 100 ccm —, wurde im Blutfiltrat nach Behandlung mit Kohle und Essigsäure nur wenig zurückgefunden, und zwar 4,7 mg (berechnet als Lactose).

Bezüglich der Untersuchungen, welche dartun, daß Lactose in Lösung bleibt, wenn die Lösung in der oben angegebenen Weise mit Kohle und Äther geschüttelt wird, kann folgendes mitgeteilt werden.

Wo 50 ccm Lösung mit 15 ccm Äther versetzt wurden, enthielt das Filtrat 71,5; wo 25 ccm Äther verwendet wurden, 71,9 mg, berechnet als Glucose; also alles wurde zurückgefunden, denn das Reduktionsvermögen der Lactose verhält sich zu dem der Glucose wie etwa 72 : 100.

Wo nur 10 ccm Äther benutzt wurden, blieb ein Teil der Lactose an Kohle gebunden.

Es wurden dann noch Lactoselösung und Glucoselösung gemischt und die Mischung mit Kohle und Äther behandelt; weiter wurde Blut mit Lactose versetzt (100 mg auf 100 ccm) und in derselben Weise verfahren. In beiden Fällen wurde die Lactose annähernd zurückgefunden.

Auch mit Maltose haben wir diese Versuche gemacht. Die Ergebnisse waren dieselben wie mit Lactose. Beim Schütteln mit Kohle und Essigsäure gingen etwa 6 Proz. der Maltose in Lösung. Mit Kohle und Äther blieb die Maltose gelöst.

Das Reduktionsvermögen der Maltose verhielt sich zu dem der Glucose wie etwa 76 zu 100.

Es wurde weiter untersucht, wie Glykogenlösungen sich Kohle und den beiden oberflächenaktiven Stoffen gegenüber verhalten.

Von einer 0,1 prom. Lösung blieb mit Kohle und Äther ungefähr die Hälfte gelöst; von einer 0,05 prom. Lösung ungefähr 80 Proz. Mit Kohle und Essigsäure bleibt nur ein kleiner Teil des Glykogens frei. Die Resultate sind hier also anders als zu erwarten war. Falls Glykogen im Blute vorkommt, wird man es wohl hauptsächlich in der zweiten Fraktion (mit Kohle und Äther-Filtrat) finden, denn der Gehalt wird im Blutfiltrat (1 : 10) gewiß nicht größer sein als 0,05 Prom.

Auch untersuchten wir, wie sich Harnsäure, Kreatinin und Kreatin bei der hier beschriebenen Methode verhalten.

Beim Behandeln mit Kohle und Essigsäure bleibt Harnsäure (zur Verwendung kamen Lösungen von 0,05 und 0,025 Prom.) vollständig an Kohle gebunden. Aus einer 0,05- und 0,025 prom. Lösung geht etwa ein Drittel mit Kohle und Äther in Lösung.

Das Reduktionsvermögen verhielt sich zu dem von Glucose wie etwa 60 : 100.

Vom Kreatinin löste sich aus einer 0,05 prom. Lösung beim Schütteln mit Kohle und Essigsäure nur wenig — etwa 12 Proz. —, während mit Kohle und Äther das Kreatinin vollständig gelöst blieb.

Das Reduktionsvermögen war etwas kleiner als die Hälfte von dem von Glucose (45 bis 47 Proz.).

Kreatin reduzierte Rotblutlaugensalz nur wenig. Das Reduktionsvermögen ist nur 13 (Glucose 100). Das Kreatin wird also bei



der Reduktion von Blutfiltraten keine große Rolle spielen. In der ersten Fraktion blieb aus einer 0,05 prom. Lösung ein Drittel in Lösung; in der zweiten hingegen löste sich das Kreatin vollständig.

Die Kohle-Essigsäurefiltrate enthalten also keine Harnsäure und so gut wie kein Kreatinin und Kreatin. In dem Kohle-Ätherfiltrat befinden sich die Hauptmengen des Kreatinins und Kreatins und etwa die Hälfte der Harnsäure.

Wir untersuchten in diesem Jahre eine große Anzahl von Blutproben von verschiedenen Tieren und Menschen mit Rücksicht auf die Frage, inwiefern neben Glucose andere Zuckerarten darin vorkommen, und arbeiteten ursprünglich zwar mit Kohle und Essigsäure, aber nicht immer mit derselben Konzentration der Essigsäure, und auch wohl mit anderen Verhältnissen zwischen Kohle und Flüssigkeit. Nur einmal haben wir dabei gefunden, daß die Reduktion des Kohle-Essigsäurefiltrats dieselbe war, wie die des Blutfiltrats selbst. Das war in dem Blute eines Diabetikers, dessen Blutzuckergehalt 309 mg in 100 ccm Blut betrug.

Vom Blute von Diabetikern mit etwa 230 und 260 mg Blutzucker aber blieb nach Behandlung mit Kohle und Essigsäure noch ein bedeutender Teil der reduzierenden Stoffe an Kohle gebunden.

Von der Untersuchung von Blutfiltraten, genau nach dem oben beschriebenen Verfahren gemacht, teile ich hier folgendes mit[1]).

Die Zahlen geben immer Milligramm Glucose auf 100 ccm Blut an.

	Total	Erste Fraktion	Zweite Fraktion	Dritte Fraktion	Zweite + dritte Fraktion
Pferdeblut	102,3	77,9	—	—	24,4
„	104,8	73,3	22,2	9,3	31,5
„	103,0	82,5	21,2	0,0	20,5
Rinderblut	72,9	53,8	—	—	19,1
Kaninchenblut*) . . .	149,8	111,8	25,5	12,5	38,0
„ **) . . .	150,1	126,0	27,6	0,0	24,1
Menschenblut	120	94,7	16,7	8,6	25,3
„	105,8	77,5	20,2	8,1	28,3

*) Das Tier hatte 16 Stunden gefastet.
**) Das Tier hatte 64 Stunden gefastet, also 2 Tage später.

Wenn man im Blute des Menschen pro 100 ccm 1 bis 2 mg Kreatinin, 4 bis 5 mg Kreatin und 2 bis 3 mg Harnsäure annimmt, so ist nach dem oben angegebenen Reduktionsvermögen dieser drei Stoffe ihr Glucoseäquivalent im ganzen höchstens 3,5 mg pro 100 ccm Blut, also nur etwa ein Achtel von der Summe der zweiten und dritten Fraktion.

[1]) Wir untersuchten immer Oxalatblut. Es wurden auf etwa 60 ccm Blut 100 mg Kaliumoxalat verwendet.

Diese drei Stoffe können unmöglich den Wert der ersten Fraktion, also des Glucosegehalts, nennenswert beeinflussen, denn nach dem, was wir gefunden haben, enthält die erste Fraktion so wenig, daß sie pro 100 ccm Blut ebensoviel Rotblutlaugensalz reduzierte wie $^1/_3$ mg Glucose.

Für die zweite und dritte Fraktion berechnen sich diese Glucoseäquivalente höchstens auf 1,9 und 1,2 mg.

Diese Werte liegen innerhalb des Gebiets der Fehlergrenzen.

Aus dieser Arbeit geht hervor, daß außer Glucose noch bedeutende Mengen von anderen reduzierenden Stoffen in den nach *Folin* und *Wu*[1]) dargestellten Blutfiltraten vorkommen, die nur zu einem kleinen Teile aus dem bekannten reduzierenden Nichtzucker, wie Harnsäure, bestehen können.

Nach der hier mitgeteilten Methode läßt sich der Glucosegehalt ziemlich genau in Blutfiltraten bestimmen und in sehr verdünnten Lösungen eine Bestimmung von Glucose neben Disacchariden (Lactose und Maltose) ausführen.

Die Untersuchungen, die mit Hilfe der Herren *A. Emmerie*, Assistent, und *H. Hooghoudt*, Analytiker, ausgeführt wurden, werden in verschiedenen Richtungen fortgesetzt. Beiden Herren spreche ich meinen Dank aus.

---

[1]) Auch gilt dies, wie wir mit einigen Proben feststellten, für Blutfiltrate nach *Hagedorn* und *Jensen* [also mit $Zn(OH)_2$ bereitet].



Ein neues Gefrierpunktsthermometer für wässerige Lösungen.

Von

Heinrich Menzel.

(Mitteilung aus dem Anorganisch-chemischen Laboratorium der Technischen Hochschule Dresden.)

(Eingegangen am 4. Januar 1927.)

Bei zahlreichen biochemischen Untersuchungen spielen die Gefrierpunktsmessungen irgendwelcher Flüssigkeiten zur Ermittlung ihrer osmotischen Konzentrationen eine große Rolle. Da es sich dabei vorwiegend um wässerige Lösungen handelt, werden bereits statt der sonst gebräuchlichen Beckmannthermometer mit veränderlichem Meßbereich vielfach solche mit festem Eispunkt benutzt. Um von den in Celsiusgraden gemessenen Gefrierpunktsdepressionen auf die osmotischen Konzentrationen zu gelangen, d. h. auf die Konzentrationen der osmotisch wirksamen Teilchen: Moleküle, Molekülkomplexe und elektrolytischen Ionen, hat man die Celsiusgradablesungen durch die Größe $E = 1{,}860^0$ C, die molekulare Gefrierpunktsdepression in 1000 g Wasser, zu dividieren, denn bekanntlich bewirkt ein Grammolekül eines undissoziiert und nicht assoziiert in 1000 g Wasser ($\sim$ 1 Liter) gelösten Stoffes eine Gefrierpunktserniedrigung von $1{,}860^0$ C, streng genommen bei unendlicher Verdünnung, in großer Annäherung aber in allen verdünnten Lösungen.

Um bei umfangreicheren Meßreihen und bei häufigerer Vornahme von Gefrierpunktsbestimmungen diese jedesmalige Umrechnung über den Wert 1,860 zu ersparen, ist ein Gefrierpunktsthermometer mit festem Nullpunkt konstruiert worden, dessen Skala nicht nach Celsiusgraden, sondern nach einer neuen Gradeinheit eingeteilt ist, die $1{,}860^0$ C gleichkommt und als *Molgrad* bezeichnet werden soll. *1 Molgrad* (*Mol*^{0}) $= 1{,}860^0$ *C*.

Eine Gefrierpunktsmessung mit dem neuen Molgradthermometer gibt also unmittelbar die angenäherte osmotische Konzentration der untersuchten Flüssigkeit an.

Das Molgradthermometer (geschützt als D. R.-G.-M. 42[i] 948927) wird von der *Firma Robert Goetze, Leipzig*, angefertigt und in zwei Ausführungen in den Handel gebracht.

Die *große Form* schließt sich in Format und Meßbereich etwa den normalen Beckmannthermometern an. Die Skala geht von + 0,1 Mol^0 bis — 2,5 oder — 2,7 Mol^0, entsprechend den sonst üblichen 5 bis 6^0 C. Die Skalenbezeichnung ist sinngemäß vom Eispunkt absteigend, d. h. in negativen Molgraden nach unten, die Teilung von 0,005 zu 0,005 Mol^0 (also in zweihundertstel Mol^0) durchgeführt, so daß mit der Lupe bequem noch die tausendstel Mol^0, bei einiger Übung sogar noch die zweitausendstel abgeschätzt werden können. Die Eichung der Instrumente wird bis zum Skalenbeginn eintauchend bei 18^0 mittlerer Raumtemperatur vorgenommen. Diese Form ist hauptsächlich zu Messungen mit der gewöhnlichen *Beckmann*schen Gefrierpunktsapparatur oder ähnlichen anderen gedacht. Auf Wunsch wird sie mit Prüfungsdaten der Physikalisch-Technischen Reichsanstalt geliefert.

Aus besonderen Gründen (mögliche Berücksichtigung des Fadenfehlers auch für Fälle, wo das Thermometer nicht bis zum Skalenanfang in das Gefriergefäß taucht, sondern noch ein Stück unterhalb desselben herausragt) wird die enge Kapillare, die längs der Skala läuft, noch eine Strecke unter der Skala in gleichem Kaliber fortgeführt, um dann erst in ein kurzes Stück einer weiteren überzugehen, die an die Quecksilberkugel angeblasen ist. Eingehenderes über die bei exakteren Bestimmungen anzubringende Fadenkorrektur, sowie einige belegende Meßreihen mit der größeren Form des neuen Molgradthermometers werden demnächst in der *Zeitschrift für Elektrochemie* mitgeteilt werden.

Die *kleine Form* des Molgradthermometers ist in seinen Ausmaßen der Gefrierpunktsapparatur für kleine Flüssigkeitsmengen nach *Drucker* und *Burian* mit freundlichem Einverständnis des Herrn Prof. *Drucker*, Leipzig, angepaßt worden. Sie umfaßt etwa 2,5 Mol^0 in Hundertstelteilung; die ursprünglichen zur gleichen Apparatur gelieferten Celsiusgradthermometer haben ein Skalenbereich von etwa 5^0 C in Fünfzigstelteilung. Von der Beibehaltung der engen Kapillare noch unterhalb der Skala wird bei diesen kleinen Instrumenten abgesehen.

Der Gebrauch des Molgradthermometers ist in keiner Weise schwieriger als der der bisher üblichen Gefrierpunktsthermometer. Da der praktische Eispunkt aus technischen Gründen nie absolut mit dem Nullpunkt der Skala zusammenfällt, und da er infolge thermischer Nachwirkungen in der Wandung der Quecksilberkugel im Laufe der Zeit kleine Verschiebungen erfahren kann, empfiehlt es sich, vor In-



gebrauchnahme des Instruments und während des Gebrauchs zwischendurch in bestimmten Zeiträumen den Eispunkt nachzukontrollieren und die entsprechende Korrektur an den Messungen in Rechnung zu ziehen.

Sämtliche Auswertungen, die an Gefrierpunktsmessungen mit dem Celsiusgradthermometer vorgenommen werden (etwa nach dem Molekulargewicht, dem *van 't Hoff*schen Faktor i, der osmotischen Konzentration, dem Dissoziationsgrad, dem osmotischen Koeffizienten f_0), gestattet noch einfacher das Molgradthermometer, indem überall statt des immer wiederkehrenden Quotienten $\Delta : E$ (Δ = Depression in Celsiusgraden, $E = 1{,}860$) die direkte Molgradablesung τ in die betreffenden Formelausdrücke einzusetzen ist.

Daher dürfte diese kleine Neuerung auch für biochemische Arbeiten bequem und vielleicht willkommen sein.

Bestimmung von Oxalsäure im Harn mit der Schaukelextraktionsmethode von Widmark.

Von

Carl G. Holmberg.

(Aus dem medizinisch-chemischen Institut Lund.)

(Eingegangen am 5. Januar 1927.)

Den am meisten benutzten Bestimmungsmethoden für Oxalsäure im Harn liegt die von *Salkowski* (1) im Jahre 1900 angegebene zugrunde. Die ursprüngliche Methode ist wiederholt modifiziert worden und man ist der Ansicht, daß die von *Mac Lean* (2) erhaltene Form zuverlässige Resultate gibt. Diese Methode leidet indessen an gewissen praktischen Nachteilen, deren Beseitigung von Bedeutung wäre. Von diesen seien folgende hervorgehoben. Die Methode ist wegen der wiederholten Eindampfungen, Ausfällungen und Filtrationen sehr umständlich und zeitraubend. Sie ist teuer, da unter anderem zu jeder Bestimmung ziemlich beträchtliche Mengen von Äther und Alkohol erforderlich sind, die nur zum Teil zurückgewonnen werden können. Bei den wiederholten Extraktionen mit dem Alkohol-Äthergemisch verursacht die Emulsionsbildung oft Komplikationen, und hierzu kommt, daß eine Extraktion mit alkoholhaltigem Äther stets unreine Extrakte geben muß. Nur mit ganz alkoholfreiem Äther kann man einen Extrakt erhalten, der keine unorganischen Bestandteile enthält. Das Ausschütteln im Scheidetrichter bietet schließlich keine Garantie für eine vollständige Extraktion.

Bei der Verwendung der Schaukelextraktionsmethode von *Widmark* (3) können die meisten dieser Übelstände vermieden werden und die Bestimmung von Oxalsäure in Lösungen wird hierdurch in hohem Grade vereinfacht, verbilligt und in wesentlichen Punkten automatisiert.

Das Prinzip für die neue Oxalsäurebestimmungsmethode ist folgendes. In das Dimittensgefäß des Doppelscheidetrichters[1]) wird der

[1]) In bezug auf das Prinzip der Schaukelextraktionsmethode wird auf oben angeführte Arbeit von *Widmark*, sowie auf eine Arbeit vom gleichen Verfasser in dieser Zeitschrift (Bd. 179, S. 263—271, 1926) über die Bestimmung von freier und gebundener Benzoesäure im Harn verwiesen.



angesäuerte Harn gebracht, in das Rezipiensgefäß eine Chlorcalciumlösung. Beide Lösungen werden mit Äther überschichtet. Beim Schaukeln des Apparats wird der Äther von dem einen in den anderen Scheidetrichter dekantiert und die Oxalsäure in die Rezipienslösung übergeführt, wo sie als Calciumoxalat quantitativ zurückgehalten wird. Auf diese Weise wird ein sehr reiner Extrakt erhalten, da keine unorganischen Verbindungen den alkoholfreien Äther passieren und nur durch Chlorcalcium fällbare organische Verbindungen im Rezipiensgefäß angesammelt werden können. Die Fällung kann dann durch Filtration abgeschieden werden und braucht vor der Titration mit Permanganat nur wenig gewaschen zu werden.

Die Vorteile der Methode können in folgenden Punkten zusammengefaßt werden:

1. Die Extraktion verläuft vollständig automatisch und gibt hierbei eine sehr reine Calciumoxalatfällung.
2. Kein vorbereitendes Eindampfen des Harns, nur eine Filtration.
3. Geringer Ätherverbrauch und keine Destillation des Äthers.
4. Genaue Bestimmungen können schon mit nur 50 ccm Harn ausgeführt werden, wodurch man in den Stand gesetzt wird, die Oxalsäureausscheidung auch bei kleinen Versuchstieren täglich festzustellen.

1. Beschreibung der Ausführung der Bestimmung.

Die erforderliche Ausrüstung besteht aus folgenden Apparaten.

1. Schaukelextraktionsapparat nach *Widmark*. Die Glasteile sind erhältlich bei *Rudolph Grave*, Stockholm, und ihre Dimension soll für eine Extraktion einer Flüssigkeitsmenge bis zu 50 ccm bemessen sein. Die Schaukel für die automatische Bewegung der Glasteile kann in jedem Institut nach der von *Widmark* gegebenen Beschreibung angefertigt werden oder sie kann auf Bestellung vom medizinisch-chemischen Institut zu Lund erhalten werden.

2. Anordnung zum Absaugen, versehen mit einem *Schott*schen Glasfilter 3 < 7, ungefähr 50 ccm fassend. Absaugkolben.

3. Eine Serie Pipetten von 3 bis 50 ccm.

4. Eine Mikrobürette nach *Pregl*, mit kleinster Teilung 0,02 ccm.

5. Kolben: Zur Aufbewahrung des Harns 2-Liter-Kolben. Eine Anzahl Erlenmeyerkolben aus Jenaglas, 250 ccm.

Lösungen:

1. 5proz. Chlorcalciumlösung.
2. 40proz. Schwefelsäure.

3. n/100 Kaliumpermanganatlösung, bereitet mit verläßlichem Titer nach einer der anerkannten Methoden. Der Titer der Lösung muß oft mit bekannter Oxalsäurelösung kontrolliert werden.

4. Waschwasser. Um Verluste beim Waschen der Oxalatfällung zu vermeiden, wird destilliertes Wasser benutzt, das durch Schütteln mit Calciumoxalat mit diesem Stoff gesättigt worden ist. Es ist von Bedeutung, daß das hierzu benutzte Oxalat durch Feinpulverisierung und reichliches Waschen von jeder Spur von freier Säure befreit wird.

5. Säure- und alkoholfreier Äthyläther.

2. Die Extraktion.

Die Tagesmenge Harn wird abgemessen und in einen 2-Liter-Kolben gebracht, der mit 20 ccm oder soviel 40proz. Schwefelsäure versetzt worden ist, daß die Lösung gegen Kongopapier sauer reagiert. Das Volumen wird vermerkt. Durch dieses Ansäuern wird vermieden, daß sich Oxalatkristalle an den Wänden des Gefäßes festsetzen und so der Bestimmung entgehen.

50 ccm dieses angesäuerten Harns werden in das Dimittensgefäß gebracht. In das Rezipiensgefäß werden etwa 20 ccm Chlorcalciumlösung eingeführt. Die beiden Lösungen werden mit 350 ccm Äther überschichtet, worauf der Apparat in Gang gesetzt wird. In der von *Widmark* angegebenen Schaukel können gleichzeitig zehn Extraktionen ausgeführt werden.

Das Schaukeln soll mit 18^0 Neigung jederseits der Horizontalebene und mit einer Geschwindigkeit von etwa 27 Sekunden für eine ganze Schaukelperiode (für eine ganze Umdrehung der treibenden Exzenterscheibe) erfolgen.

Die Extraktionszeit ist wegen der geringen Löslichkeit der Oxalsäure in Äther, verglichen mit der in Wasser, sehr lang, was aber nicht besonders störend wirkt, da dieselbe fast ohne Überwachung und gleichzeitig mit bis zu zehn Proben erfolgen kann.

Die Extraktionszeit wurde bestimmt, indem bekannte, reine Oxalsäurelösungen während verschiedenen Zeiten gegen Lauge extrahiert und diese danach, wie für die Bestimmung der Extraktionszeiten der Benzoe- und Hippursäure in obiger Fußnote angeführter Arbeit beschrieben, titriert wurde. Da der Übergang der Säure proportional der im Dimittensgefäß verbliebenen Menge erfolgt, ist die Extraktionszeit bei konstantem Flüssigkeitsvolumen von der Konzentration der Oxalsäure in der Probe unabhängig und demnach die Zeit für praktisch genommen vollständige Extraktion für große wie für kleine Mengen gleich. Die Extraktionszeit variiert aber etwas bei verschiedenen Apparaten, was auf der verschiedenen Weite des Kommunikationsrohres



zwischen den beiden Behältern beruht. Die kürzeste von mir bestimmte Extraktionszeit betrug 46 Stunden bei einem Apparat mit sehr enger Öffnung, die längste Extraktionszeit 75 Stunden bei einem Apparat mit sehr weiter Öffnung. *Praktisch genommen dürfte eine Extraktionszeit von 75 Stunden ein zufriedenstellendes Resultat garantieren.* Will man die Konstante der Extraktionsgeschwindigkeit für jeden Apparat kennen, was für ein exaktes Arbeiten wünschenswert ist, so kann diese nach der von *Widmark* in oben erwähnter Benzoesäurearbeit angegebenen Anweisung bestimmt werden. Hierbei ist die Konstante der Extraktionsgeschwindigkeit zweckmäßig aus jenen Werten zu ermitteln, die man nach einer achtstündigen Extraktion einer im Dimittensgefäß angesäuerten 0,03 n Lösung von Kaliumoxalat erhält.

Im Verlauf der Extraktion wird dann die Oxalsäure vom Harn in das Rezipiensgefäß übergeführt und als Calciumoxalat ausgefällt, eine Fällung, die wegen ihrer Leichtigkeit und Geringfügigkeit wenigstens zum größten Teile sich an der Begrenzungsschicht zwischen Äther und Chlorcalciumlösung ansammelt. Bei größeren Mengen Säure kann es zuweilen vorkommen, daß sich eine zusammenhängende Haut bildet, die die Extraktion recht beträchtlich verlängern kann. Die Haut muß dann zerstört werden, indem man den Extraktionsapparat einmal im Laufe der Extraktion vorsichtig schüttelt, so daß die Fällung zu Boden sinkt.

3. Die Titration.

Wenn die Extraktion beendet ist, wird das Extraktionsgefäß aus der Schaukel genommen und der Bodenhahn des Rezipiensgefäßes über dem in einen Absaugkolben eingesetzten Filtrierglas geöffnet. Durch dieses wird die ganze Chlorcalciumlösung abfließen gelassen, wobei eine eventuell mitfolgende Fällung abfiltriert wird. Wenn der Äther den Hahn erreicht hat, wird dieser geschlossen und erst jetzt wird der Harn abgelassen und dann der Äther durch den Hahn des Dimittensgefäßes. Um den geringen Ätherrest zu entfernen, der beim Dekantieren im Rezipiensgefäß zurückgeblieben ist, saugt man einige Minuten einen starken Luftstrom durch den Apparat. Hierbei wird zweckmäßig so vorgegangen, daß der Schlauch einer Wasserstrahlpumpe einige Zentimeter in das Pfropfenloch des Rezipiensgefäßes eingeführt wird, wobei gleichzeitig der Bodenhahn und das Pfropfenloch des Dimittensgefäßes offengelassen werden.

Die im Rezipiensgefäß zurückgebliebene Fällung, sowie jener Teil, der in das Filtrierglas gespült worden ist, werden nun auf folgende Weise gewaschen. Man setzt in das Pfropfenloch des Rezipiensgefäßes einen Trichter, dessen langes Rohr ungefähr 2 cm über dem Boden des Gefäßes endigt, damit das Waschwasser nicht entlang den Wänden

herabrinnt, wodurch die leichte Fällung hinaufkriechen und leicht verloren gehen würde. Man führt zweimal nacheinander 30 ccm Waschwasser ein, das jedesmal nach beendigtem Auffüllen durch den Bodenhahn über die am Filter befindliche Fällung ausfließen gelassen wird. Hierdurch wird sowohl die im Rezipiensgefäß wie am Filter befindliche Fällung hinreichend gewaschen.

Nach dem Waschen wird die ganze Fällung in Schwefelsäure gelöst. Nach dem Einsetzen des Filtrierglases in einen neuen, sorgfältig gereinigten Absaugkolben werden durch den Trichter in das Rezipiensgefäß dreimal nacheinander 10 ccm warme, 40proz. Schwefelsäure eingegossen, die in ihrer Gänze am Filter gesammelt wird, bevor man absaugt. Die Schwefelsäure muß im unteren Teile des Rezipiensgefäßes gut herumgeführt werden, so daß sie Gelegenheit hat, dort alle vorhandene Fällung aufzulösen. Schließlich wird das Rezipiensgefäß und das Filter auf die gleiche Weise mit destilliertem Wasser (das nicht mit Calciumoxalat gesättigt worden ist) nachgespült, bis die Schwefelsäure quantitativ in den Absaugkolben übergeführt ist. Von hier aus wird die Lösung quantitativ in einen Erlenmeyerkolben aus Jenaglas überführt und man titriert auf die gewöhnliche Weise mit n/100 Kaliumpermanganatlösung. 1 ccm dieser Lösung entsprechen 0,45 mg Oxalsäure.

4. Prüfung der Methode.

Die Methode ist teils an bekannten reinen Oxalsäurelösungen, teils durch Bestimmungen an Harn sowie schließlich durch Bestimmungen des Oxalsäuregehalts von Harn, dem bekannte Mengen Oxalsäure zugesetzt waren, geprüft worden.

Tabelle I.

Bestimmung bekannter Oxalsäuremengen in reiner Lösung.

Berechnete Menge Oxalsäure mg	Gefundene Menge mg	Fehler mg	Fehler Proz.	Berechnete Menge Oxalsäure mg	Gefundene Menge mg	Fehler mg	Fehler Proz.
118	118	0	± 0	2,23	2,22	0,01	— 0,5
12,3	12,2	0,1	— 0,8	1,58	1,49	0,09	— 5,8
11,7	11,7	0	± 0	1,24	1,19	0,05	— 4,0
10,5	10,6	0,1	+ 0,9	1,02	1,02	0	± 0
2,76	2,72	0,04	— 1,5				

Aus diesen Bestimmungen ergibt sich, daß die Methode für so schwankende Mengen wie von 118 bis 1,02 mg Oxalsäure verwendbar ist. Für Mengen über 3 mg müssen stärkere Permanganatlösungen als n/100 benutzt werden. Im Harn kommen aber so geringe Mengen vor, daß immer die schwächere Lösung verwendet werden muß. Der absolute Fehler übersteigt nicht 0,1 mg.

Tabelle II.

Bestimmungen des Oxalsäuregehalts vom Harn. Versuchsperson 24 Jahre alt, 57 kg. Gemischte Diät.

Datum	Tagesmenge Harn + 40 ccm H_2SO_4	Gefundene Menge Oxalsäure pro 50 ccm angesäuerten Harn			Tagesmenge Oxalsäure
1926	ccm	mg	mg	mg	mg
27. V.	550	2,03	2,21	—	23,3
1. VI.	645	2,03	2,03	—	26,2
2. VI.	1510	1,06	1,06	—	32,0
3. VI.	650	2,82	2,84	2,88	36,9
8. VI.	740	1,46	1,35	—	20,8
11. VI.	925	1,31	1,22	1,28	23,5
15. VI.	990	1,49	1,53	1,44	29,4
16. VI.	1290	1,70	1,68	1,68	43,5

Die Übereinstimmung zwischen den verschiedenen Bestimmungen mit dem gleichen Harn ist ungefähr gleich gut, wie bei den Versuchen mit reinen Lösungen. Ob die absoluten Werte richtig sind, läßt sich wohl kaum beweisen. Sie stimmen indessen ihrer Größenordnung nach gut mit den Werten überein, die mit der Methode von *Salkowski* erhalten worden sind. Als Beispiel hierfür kann angeführt werden, daß *Mislowitzer* (4) mit dieser Methode in vier Versuchen Werte erhielt, die, auf 1000 ccm Harn berechnet, zwischen 18,8 und 29,7 mg variierten. Werden diese Grenzen für die Tagesmenge 1500 ccm umgerechnet, erhält man 27,2 und 44,6 mg. Die Tagesmengen in den obenstehenden von uns ausgeführten Versuchen liegen zwischen 23,3 und 43,5 mg, wobei aber zu beachten ist, daß der Harn bei diesen Versuchen wegen des warmen Wetters oft sehr konzentriert gewesen ist.

Von calciumfällenden Säuren könnten möglicherweise Citronensäure und Harnsäure die Ursache zu hoher Werte für Oxalsäure bilden. Die erste Säure dürfte unter normalen Verhältnissen nicht im Harn vorkommen und da sie außerdem in Äther praktisch genommen unlöslich ist, braucht auf sie nicht Rücksicht genommen zu werden.

Daß die Harnsäure nicht stört, wurde durch die Bestimmung von Oxalsäure in folgenden Lösungen von 50 ccm Volumen kontrolliert.

Lösung	Kaliumoxalat mg	Natriumurat mg
I	0	35
II	1,21	0
III	1,21	35

Die Lösungen wurden mit 3 ccm n/5 Schwefelsäure versetzt und mit Calciumchloridlösung extrahiert. Die Lösung I ergab keine nachweisbare Fällung, Lösung II gab 1,19 mg und Lösung III 1,18 mg Oxalsäure.

In Tabelle III habe ich schließlich einige Versuche zusammengestellt, die zeigen, daß man, wenn man Harn mit einer bekannten Menge Oxalsäure versetzt, Werte erhält, die sehr genau der durch den Zusatz verursachten Erhöhung entsprechen.

Tabelle III.

Versuch	Präformierte Säure in 50 ccm Harn mg	Zugesetzte Säure mg	Präformierte + zugesetzte Säure mg	Gefundene Menge mg	Differenz mg
a	1,46	5,13	6,59	6,48	— 0,11
b	1,31	1,08	2,39	2,30	— 0,09
c	1,28	1,05	2,33	2,18	— 0,15
d	2,97	1,04	4,01	3,96	— 0,05
e	1,49	1,00	2,49	2,53	+ 0,04
f	1,68	1,02	2,70	2,70	± 0,00

Literatur.

1) *E. Salkowski,* Zeitschr. f. physiol. Chem. **29**, 437 bis 460, 1900; Prakt. d. physiol. u. pathol. Chem. 1912, 4. Aufl. — 2) *H. Mac Lean,* ebendaselbst **60**, 20 bis 24, 1909. — 3) *E. M. P. Widmark,* Skand. Arch. f. Physiol. **84**, 61 bis 71, 1926. — 4) *E. Mislowitzer,* diese Zeitschr. **126**, 77 bis 81, 1921.

Über die Bildung von reiner d(—)-Milchsäure durch frische Hefen und Trockenhefe sowie von d,l-Milchsäure durch Hefenmazerationssaft.

Von

Carl Neuberg und Maria Kobel.

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für Biochemie in Berlin-Dahlem.)

Gleich nach Auffindung der *Ketonaldehydmutase* hat der eine von uns[1]) mitgeteilt, daß dieses Ferment *wie in Tierorganen ebenso in Mikroben*, z. B. in der Hefe vorkommt und daß diese aus Methylglyoxal Milchsäure erzeugt. Die Fortführung dieser Untersuchungen hat ergeben, daß die Ketonaldehydmutase ein überaus verbreitetes Enzym ist und selten in einer Zellenart vermißt wird, die wesentliche Funktionen des Kohlenhydratumsatzes erfüllt. So hat sich gezeigt, daß auch die häufige Bildung von Milchsäure bei Bakterien[2]) ungezwungen durch die Dismutation intermediär gebildeten Methylglyoxals erklärt werden kann. Ein gleiches gilt für die Gewebe höher entwickelter Vegetabilien; sie enthalten[3]) ebenfalls Ketonaldehydmutase und sind zu der Überführung des Methylglyoxals in Lactat befähigt, auf dessen Auftreten während der anaeroben Atmung der Samenpflanzen *J. Stoklasa*, *G. Muenk* sowie *J. Bodnár* hingewiesen haben. Schon in unserer Abhandlung aus dem Jahre 1913 war die wichtige Rolle des neuen Enzyms hervorgehoben mit anschließenden Betrachtungen über die *eigenartigen stereochemischen Effekte*, die von den bis dahin vorliegenden Erfahrungen in bedeutungsvoller Weise abwichen. Durch *Isolierung des Lactats in Substanz* hatten wir nämlich den Nachweis geführt, daß aus dem strukturell inaktiven Methylglyoxal rund 70 Proz. der möglichen Menge Milchsäure hervorgingen. und daß ihr Zinksalz in dieser Ausbeute aus reinem rechtsdrehenden, also zur d(—)-Milchsäure gehörigen milchsauren Zink bestand (diese Zeitschr. **51**, 508, 1913).

War es also damals gelungen, das *Methylglyoxal-hydrat asymmetrisch und jedenfalls zu mehr als 50 Proz.* in *eine* aktive Raumform der Milchsäure umzulagern, so ist es später *P. Mayer*[4]) geglückt, beim homologen *Phenylglyoxal-hydrat* die praktisch *quantitative Umformung* des gleichfalls ein asymmetrisches Kohlenstoffatom entbehrenden Ausgangs-

---

[1]) *C. Neuberg*, diese Zeitschr. **51**, 484, 1913.

[2]) *C. Neuberg* und *G. Gorr*, ebendaselbst **162**, 490, 1925; **166**, 482, 1925; *G. Gorr* und *G. Perlmann*, ebendaselbst **174**, 433, 1926.

[3]) *C. Neuberg* und *G. Gorr*, ebendaselbst **171**, 475, 1926; **173**, 358, 1926; *G. Binder-Kotrba*, ebendaselbst **174**, 443, 1926.

[4]) *P. Mayer*, ebendaselbst **174**, 420, 1926.

materials — je nach Wahl der Zellart — in *d- oder l-Mandelsäure* zu bewirken. Nehmen wir hinzu, daß von uns im Jahre 1913, in das auch die Veröffentlichungen von *Dakin* und *Dudley* sowie *Levene* und *Mayer* fallen, bereits[1]) die Anschauung entwickelt worden ist, nach der die *Milchsäure*, die beim Zuckerabbau auftritt, *als Stabilisierungsprodukt des Methylglyoxals* aufzufassen und das Methylglyoxal selbst entsprechend einzuordnen ist, so hat in den vergangenen 14 Jahren die Forschung über die enzymatische Dismutation des Methylglyoxals an beachtenswerten Ergebnissen nur noch den Nachweis von *O. Meyerhof*[2]) sowie von *R. Kuhn* und *R. Heckscher*[3]) zutage gefördert, daß von Gesichtspunkten der Kinetik aus sich ebenfalls keinerlei Einwendungen gegen die Methylglyoxal-hypothese der desmolytischen Milchsäurebildung ergeben. Außerdem haben *E. Toenniessen* und *W. Fischer*[4]) den grundlegenden Befund mitgeteilt, daß Methylglyoxal als Abbauprodukt der Hexose im tierischen Stoffwechsel nachgewiesen werden kann, und ein gleiches behauptet *E. Aubel*[5]) für Kleinlebewesen.

Bei der als recht universell anerkannten Fähigkeit der Zellen zur Milchsäureproduktion schien es uns nun möglich, den früher allein mit obergäriger Hefe bewirkten mäßigen Umfang der Dismutation von Methylglyoxal zur Milchsäure zu vergrößern und damit neue Gesichtspunkte für die Stellung des Methylglyoxals im Stoffhaushalt der Hefen zu gewinnen. Diese Erwartung hat sich durchaus erfüllt. Durch Wechsel des Materials und durch Änderung der Mengenverhältnisse sind wir nicht allein dazu gelangt, Methylglyoxal-hydrat mit auffallender Schnelligkeit und quantitativ durch Hefen und Hefenpräparate umzusetzen, sondern auch die Ausbeute an Milchsäure weit höher als früher zu treiben. Für Fragen von solcher Wichtigkeit scheint es uns nicht angängig, lediglich das Verschwinden des Methylglyoxals oder eine Säurebildung festzustellen, auf eine Farbreaktion hin auf Milchsäure zu schließen, oder auch durch die konventionelle Bestimmungsmethode nach *Clausen* den Gehalt an Milchsäure zu errechnen, sondern wir halten es für eine unerläßliche Notwendigkeit, die Milchsäure außerdem in Substanz zu isolieren, durch Analysen ihr Vorliegen zu beweisen sowie mittels optischer Konstanten ihre Konfiguration zu bestimmen. Schon früher hat der eine von uns, wie erwähnt, bei Versuchen mit der Ketonaldehydmutase tierischer Herkunft vermocht, *kristallisiertes Zinklactat* zu 70 Proz. der theoretischen Menge rein abzuscheiden, und wir sind, abweichend von *Kuhn* und *Heckscher* (l. c.), der Meinung,

---

[1]) *C. Neuberg*, Der Zuckerumsatz der Zelle. Jena **1913**.
[2]) *O. Meyerhof*, diese Zeitschr. **159**, 432, 1925.
[3]) *R. Kuhn* und *R. Heckscher*, H. **160**, 116, 1926.
[4]) *E. Toenniessen* und *W. Fischer*, H. **161**, 254, 1926.
[5]) *E. Aubel*, C. r. **183**, 572, 1926.

daß dieses Ergebnis ein vorzügliches gewesen ist. Zu unseren neuen Hefenversuchen benutzten wir sowohl *obergärige Hefe von Sinner* als *untergärige Hefe der Schultheiß-Patzenhofer Brauerei*. Letztere kam auch in Form von *Trockenhefe* zur Anwendung, und aus ihr wurde ferner der benötigte zellenfreie *Hefenmazerationssaft* bereitet. *Mit sämtlichen der erwähnten Hefenmaterialien war es möglich, Methylglyoxal quantitativ umzusetzen.* Je nach Menge der frischen Hefe brauchten wir zur Umwandlung einer etwa m/10 bis m/15 Methylglyoxallösung 1 bis 6 Tage, ohne daß wir damit das Maximum der Geschwindigkeit erreicht zu haben glauben; mit *Trockenhefe* wenigstens ist die *totale Verarbeitung* einer rund m/15 Methylglyoxal-lösung bereits *in drei Stunden* vollzogen, und *Hefenmazerationssaft* bringt sie ebenso schon *in 2½ bis 3 Stunden* zuwege!

Die Versuche sind mit und ohne Zusatz von Zucker ausgeführt worden. Eine gewisse Differenz in der Geschwindigkeit der Methylglyoxal-umwandlung war zwischen den zuckerhaltigen Proben und den zuckerfreien Kontrollen zu konstatieren, wobei es auffiel, daß mit wenig Hefe in Anwesenheit von Kohlenhydrat das Methylglyoxal schneller verschwand. Eine bemerkenswerte Abweichung macht sich nach unseren bisherigen Ergebnissen zwischen diesen beiden Arten der Versuchsanstellung dadurch geltend, daß bei simultaner Vergärung von Rohrzucker *infolge phytochemischer Reduktion des Methylglyoxals* eine, wenn auch mäßige Menge, 5 Proz. der Theorie, an *Propylenglykol*, $CH_3 . \overset{*}{C}HOH . CH_2OH$, gebildet wird. Dieses ist optisch aktiv, und zwar lävogyr, genau so wie das früher von *E. Färber*, *F. F. Nord* und *C. Neuberg*[1]) durch phytochemische Reduktion des Acetols gewonnene Propylenglykol (α, β-Di-oxy-propan).

Zum Unterschiede von den im Jahre 1913 von *Neuberg* ausgeführten Versuchen haben wir zunächst ohne Zugabe eines die Reaktion regulierenden Bodenkörpers (Calciumcarbonat) gearbeitet und vielmehr die Wasserstoffionen-konzentration fortbestehen lassen, die sich in dem Gemisch von Hefenmaterial und Methylglyoxallösung von selber einstellt. Dieses ist deshalb geschehen, um zu sehen, ob auch bei der naturgemäß wachsenden Acidität des Gemenges die Umwandlung zu Ende geht. Dies ist der Fall, indem wir zum Schluß ein p_H von durchschnittlich 3,7 konstatierten, während nach den von *Kuhn* und *Heckscher* für tierisches Ferment gemachten Angaben bei $p_H = 4$ jede Wirkung der Ketonaldehydmutase erlöschen soll.

Schon rein äußerlich vermag man die fortschreitende Entstehung von Säure in den Versuchen mit Hefensaft zu erkennen; denn in diesen

---

1) *E. Färber, F. F. Nord* und *C. Neuberg*, diese Zeitschr. **112**, 313, 1920; vgl. *P. A. Levene* und *A. Walti*, Journ. biol. chem. **68**, 418, 1926.



tritt mit zunehmender Umwandlung des Methylglyoxals eine bis zur Flockung sich verstärkende Trübung auf, die man auf Säureflockung der im Mazerat vorhandenen Hefenproteine beziehen muß; natives Pferdeserum oder auch eine klare Eieralbuminlösung, die keine Ketonaldehydmutase enthalten, werden nämlich von säurefreiem Methylglyoxal der angewendeten Konzentration während der angegebenen Versuchszeit nicht getrübt, geschweige geflockt.

Überhaupt ist das Methylglyoxal von außerordentlich beachtenswerter Ungiftigkeit für lebende Ober- und Unter-hefen. Fügt man die hochkonzentrierte 10proz. Methylglyoxallösung auf einmal zu einer gärenden Zuckerlösung, so daß diese dann in bezug auf den Ketonaldehyd eine Molarität von $^1/_{10}$ bis $^1/_{15}$ besitzt, so findet keine Unterbrechung der Gärung statt. Zu Beginn erfolgt sogar eine Gärungsbeschleunigung, im Einklange mit der schon früher von einem von uns beschriebenen[1]) stimulierenden Kraft dieses Ketonaldehyds.

Das Propylenglykol, das, wie erwähnt, bei der gemeinsamen Digestion von Methylglyoxal mit Zucker durch Hefe gebildet wird, sofern letzterer Zeit zur völligen Vergärung findet, wurde nach folgendem Prinzip isoliert. Das Gärgut wurde filtriert, mit alkalifreiem Zinkcarbonat zur Absättigung der entstandenen Säure gekocht, erneut filtriert und im *Faust-Heim*schen Verdunstungskasten zu Sirup konzentriert. Aus diesem zog bei vielfachem Auskneten kalter absoluter Alkohol das 1,2-Propandiol aus, das dann nach Verjagen des Weingeistes und Wiederaufnahme des Rückstandes in absolutem Alkohol, im Grunde genommen nach der früher zur Darstellung des Gärungs-Glycerins ausgearbeiteten Methodik[2]), in destillationsfähigen Zustand übergeführt wurde. Die Rektifikation im Vakuum ergab dann das Propylenglykol, das außer durch Siedepunkt und Drehungsvermögen durch Oxydation mit Natriumhypobromit in eine *Fehling*sche Lösung äußerst stark reduzierende Substanz (wahrscheinlich eine Mischung von Acetol und Milchsäurealdehyd) übergeführt wurde; diese lieferte mit p-Nitrophenylhydrazin in essigsaurer Lösung das beweisende Methylglyoxal-p-nitro-phenylosazon.

Dieselbe Verbindung, die von *C. Neuberg* und *E. Kansky*[3]) 1908 beschrieben worden ist, haben wir übrigens als sicherstes Mittel zur Erkennung und Bestimmung noch vorhandenen Methylglyoxals, wie in allen unseren einschlägigen älteren[4]) Arbeiten, auch hier verwendet. Fällt die p-Nitro-phenylosazon-Probe negativ aus, so ist mit Bestimmtheit das Methylglyoxal verschwunden. Selbst in Gegenwart von Zucker

---

[1]) *C. Neuberg*, diese Zeitschr. **88**, 145, 1918.

[2]) *C. Neuberg* und *E. Reinfurth*, diese Zeitschr. **92**, 234, 1918.

[3]) *C. Neuberg* und *E. Kansky*, Ber. **41**, 956, 1908.

[4]) *Zuerst* bei *C. Neuberg*, diese Zeitschr. **49**, 504, 1913.

ist die Reaktion ausführbar; denn bei Zusammengießen der Lösungen in der Kälte und zehnminütigem Zuwarten reagiert der Zucker noch nicht unter Osazonbildung, während aus dem Ketonaldehyd Methylglyoxal in dieser Zeit das Di-hydrazon (= Osazon) ohne weiteres entsteht. Wie früher schon wiederholt hervorgehoben wurde, ist die Wägung des p-Nitro-phenylosazons eine quantitative Methode, und mit ihr ließ sich dartun, daß während der Versuchszeit die unspezifische Umwandlung unseres vollkommen reinen Methylglyoxals hier, d. h. in Abwesenheit von Calciumcarbonat, nicht mehr als 3 Proz. betrug.

Das gleiche Verfahren kam zur Anwendung für die Feststellung des Dismutationsvorganges bei jenen Versuchen, in denen infolge geringer Hefenzugabe nur eine etwa 50proz. Umwandlung des Substrats bewirkt war. Mit Ausnahme dieser Ansätze, in denen durch beabsichtigte Beschränkung des Fermentmaterials ein nur teilweiser Verbrauch des Methylglyoxals herbeigeführt war, ist in allen übrigen Ansätzen die Ausgangssubstanz vollständig verschwunden gewesen. Wir beziehen dieses Ergebnis noch nicht auf eine 100proz. Überführung in Milchsäure. Die üblichen Milchsäureanalysen nach *Clausen* und den an diesem Verfahren angebrachten Modifikationen ergaben, je nach der Versuchsanordnung, bei frischen Hefen eine Ausbeute an Milchsäure von 47 bis 82 Proz., bei Trockenhefe 62 bis 77 Proz. und bei Hefensaft 73 bis 88 Proz.

Wir möchten an dieser Stelle abermals hervorheben, daß diese bedeutende Menge Milchsäure schon in der kurzen Zeit von 2½ bis 3 Stunden in einer Flüssigkeit erzielt wurde, die in bezug auf Methylglyoxal einen Gehalt gleich m/10 bis m/15 aufwies. Wir wollen es zum Gegenstande einer besonderen Untersuchung machen, ob die an sich vortreffliche Milchsäure-bestimmungs-Methode in der bisher geübten Form auch für solche Fälle zuverlässig ist, in denen niedere Spaltungsprodukte des Eiweißes vorhanden sind; denn weder durch die Enteiweißung nach *Schenk* noch die nach *Folin-Wu* werden Proteosen und Aminosäuren fortgeschafft. Hierzu müßte das Verfahren nach *Neuberg* und *Kerb* herangezogen oder auf das Prinzip der *Ohlsson*schen Methode zurückgegriffen werden. Immerhin haben wir durch Anstellung von Blindversuchen an Proben, in denen frische Hefen, Trockenhefen und Hefenmazerationssäfte ohne Methylglyoxalzusatz unter identischen Bedingungen digeriert waren, den dann wirklich oder scheinbar vorhandenen Milchsäuregehalt ermittelt und ihn von dem im jeweils zugehörigen Hauptversuch erhaltenen Ertrag in Abzug gebracht. Die erwähnten Ausbeutezahlen, die bei den wechselnden Versuchsbedingungen von 47 bis 88 Proz. reichen, sind die auf enzymatische Methylglyoxal-umwandlung sich beziehenden Werte.

Daß mit einem Fehler der bisherigen Methode der Milchsäurebestimmung (Oxydation zu Aldehyd) vielleicht gerechnet werden

muß, ergibt sich nun daraus, daß die von uns in den Versuchen mit frischer Hefe isolierte Milchsäure den *reinen optischen Antipoden* der sonst in der Natur vorkommenden Raumform der Milchsäure darstellt. Die im Blindversuch scheinbar ermittelte Milchsäure müßte doch wohl gewöhnliche l(+)- oder d, l-Milchsäure sein. Unser Vorgehen bei der Isolierung und der Kristallisation (s. experimenteller Teil) bürgt aber dafür, daß nicht etwa die durch Kombination mit der anderen Komponente sich bildende oder präformierte Razemform entfernt wird. (*Viel geringere* Löslichkeit des d, l-Zinklactats!) Zugleich beweist die Isolierung des Zinksalzes der reinen d(—)-Milchsäure, daß tatsächlich die spezifische Dismutation des Methylglyoxals die vorherrschende Reaktion ist. Im Gegensatz zu dem Effekt der lebenden Hefe ging aus der Behandlung des Methylglyoxals mit zellfreiem Mazerationssaft — in Übereinstimmung mit den älteren Beobachtungen des einen von uns — die d, l-Milchsäure hervor. Nicht unerwähnt bleibe, daß wir Anzeichen dafür gefunden zu haben glauben, daß ein Teil des Methylglyoxals von Hefe vergoren wird. Auf diese Frage behalten wir uns vor, zurückzukommen, wie auch auf verschiedene Konsequenzen, die sich aus früheren Erfahrungen auf diesem Gebiete sowie aus den vorstehenden Ausführungen nebst nachfolgenden analytischen Daten ergeben.

Das als Substrat verwendete Methylglyoxal war nach der vorzüglichen Vorschrift von *H. O. L. Fischer* und *C. Taube*[1]) aus Dioxyaceton gewonnen und lag nach zweimaliger Rektifikation in völlig reinem Zustande vor. Sofort nach der letzten Destillation wurde eine rund 10proz. wässerige Lösung bereitet und in dieser der genaue Gehalt an Ketonaldehyd durch Darstellung und Wägung des p-Nitro-phenylosazons ermittelt.

I. Versuche mit frischen Hefen als Fermentmaterial.

A. Oberhefe Sinner.

1. Versuchsreihe.

1. 100 ccm 25proz. Rohrzuckerlösung, 37,5 g frische Oberhefe, mit Wasser auf 275 ccm aufgefüllt; nach Angärung[2]) Zugabe von 25 ccm Methylglyoxallösung, enthaltend 2,3726 g reinen Ketonaldehyd.
2. 100 ccm 25proz. Saccharoselösung, 37,5 g der Oberhefe, mit Wasser auf das Volumen von 300 ccm gebracht.
3. 18,75 g Hefe, mit Wasser auf 137,5 ccm aufgefüllt; 12,5 ccm Methylglyoxallösung, enthaltend 1,1863 g Methylglyoxal.
4. 137,5 ccm Wasser; 12,5 ccm Methylglyoxallösung, enthaltend 1,1863 g reines Methylglyoxal.

---

[1]) *H. O. L. Fischer* und *C. Taube*, B. 57, 1502, 1924; 59, 857, 1926.

[2]) Die Einleitung einer vorangehenden Angärung ist nicht wesentlich.

Täglich entnahmen wir den Ansätzen, die *hier wie in allen übrigen Fällen* bei einer 23° nicht übersteigenden Zimmertemperatur stehen blieben, einige Kubikzentimeter und ermittelten den Methylglyoxalgehalt durch die Osazonprobe sowie den Zuckergehalt durch Prüfung mit *Fehling*scher Mischung, falls das Methylglyoxal verbraucht war. Nach 6 Tagen war in einer filtrierten Probe von Ansatz 1 kein Methylglyoxal mehr nachzuweisen und der Zucker war hier wie in Ansatz 2 vergoren. In Ansatz 3 schritt der Methylglyoxal-schwund zwar von Tag zu Tag weiter fort, ging aber nicht bis zu Ende. In diesem Ansatz wurde deshalb bei Abbruch der Versuchsserie eine Restbestimmung des Methylglyoxals durch Darstellung und Wägung des p-Nitro-phenylosazons ausgeführt. Es ergab sich, daß noch 48,1 Proz. des ursprünglichen Methylglyoxals zugegen waren. In Ansatz 4 erfolgte zur gleichen Zeit eine Ermittlung des Methylglyoxals; 97,5 Proz. der anfänglichen Menge waren noch unverändert.

Über den Endgehalt der Ansätze 1 und 2 an Säure unterrichteten wir uns approximativ auf alkalimetrischer Basis, während die eigentliche Analyse nach dem Oxydations-Titrations-Verfahren geschah.

Titration. 15 ccm von Ansatz 1 verbrauchten nach Kochen mit überschüssiger Natronlauge und Zurücktitrieren mit Salzsäure 15,7 ccm n/10 NaOH; 15 ccm von Ansatz 2 benötigten 3,7 ccm n/10 Lauge. Die Differenz, 12 ccm n/10 Natriumhydroxyd, würde der gebildeten Milchsäure, nämlich 0,108 g in 15 ccm entsprechen. Im ganzen Ansatz (300 ccm) wären demnach 2,160 g Milchsäure; ber. 2,966 g. Eine Ausbeuteberechnung führt also zu 73 Proz. der Theorie.

Zur *Milchsäurebestimmung* nach *Clausen* bzw. *Hirsch-Kaufmann* erübrigte sich die Eiweißfällung nach *Schenk*, da nach dem Abfiltrieren der festen Hefenbestandteile der Zusatz von Salzsäure und Quecksilberchlorid keinen Niederschlag mehr hervorrief. Dagegen erwies es sich als nötig, den durch alkoholische Gärung gebildeten Weingeist zu entfernen. Man erreicht das ohne Verlust an Milchsäure, indem man das klare Zentrifugat mit Natronlauge neutralisiert, mit Phosphorsäure ganz schwach ansäuert und langsam dreimal auf dem Wasserbade abdampft. Nach Aufnehmen in Wasser erfolgte die Entfernung der Kohlenhydrate in üblicher Weise durch Kupfer-Kalk und anschließend die Oxydation mit Permanganat.

Für Ansatz 1 ergab sich so in 1 ccm 6,792 mg Milchsäure, für Ansatz 2 nur 0,282 mg scheinbare Milchsäure. Nach Abzug dieser Menge von dem Wert des Ansatzes 1 erhält man den eigentlichen Gehalt an Milchsäure, nämlich 6,510 mg auf 1 ccm Urlösung. Im ganzen Ansatz (300 ccm) wären tatsächlich 1,953 g Milchsäure, gegen 2,966 g berechneter, d. h. 66 Proz. der Theorie, vorhanden.

Isolierung des milchsauren Zinks.

150 ccm des klaren Zentrifugats von Ansatz 1 wurden mit Natronlauge neutralisiert, mit Phosphorsäure schwach angesäuert, im Vakuum eingeengt, stärker phosphorsauer gemacht, mit schwefelsaurem Ammonium gesättigt, filtriert, mit konzentrierter Ammonsulfatlösung nachgewaschen und im Perkolator erschöpfend extrahiert. Darauf wurde der Ätherauszug verdampft, der Rückstand in Wasser gelöst, etwa ½ Stunde gekocht, mit 20 g ausgewaschenem Bleicarbonat bis zur völligen Neutralisation im Wasserbade erhitzt, in Eis abgekühlt, filtriert und mit Eiswasser nachgewaschen. Das klare Filtrat wurde mit Schwefelwasserstoff entbleit, filtriert und von gelöstem Schwefelwasserstoff durch einen Luftstrom befreit. Die klare milchsäurehaltige Flüssigkeit wurde mit 10 g alkalifreiem Zinkcarbonat bis zur neutralen Reaktion im siedenden Wasserbade digeriert, abgesaugt und gut nachgewaschen; das klare Filtrat, aus dem sich manchmal, aber keineswegs immer, noch ein Flöckchen irgend einer Verunreinigung abschied, wurde auf dem Wasserbade verdampft und der Rückstand an der Luft getrocknet. Ausbeute 1,868 g milchsaures Zink. Nach Umkristallisation aus heißem Wasser und Trocknen an der Luft diente das Salz zur Analyse und Polarisation.

a) Wasserbestimmung.

0,1850 g lufttrockenes Salz verloren bei 105° 0,0241 g H_2O.

β) Zinkoxydbestimmung.

0,1416 g lufttrockenes Salz gaben 0,0416 g ZnO;
0,1222 g „ „ „ 0,0359 g ZnO.

$Zn(C_3H_5O_3)_2 + 2\,H_2O$. Ber.: H_2O = 12,89 Proz.; ZnO = 29,11 Proz.
Gef.: H_2O = 13,03 „ ; ZnO = 29,40 „ ;
ZnO = 29,36 „ .

γ) Drehungsbestimmung.

Eine 2,457 proz. wässerige Lösung, die 0,2821 g lufttrockenes Zinksalz in 10,0 ccm enthielt, zeigte im 2-dcm-Rohr eine Ablenkung von $\alpha = +0{,}41^0$. $[\alpha]_D = +8{,}3^0$.

Es liegt also das Zinksalz der reinen d(—)-Milchsäure vor, da dieses in 2,5 proz. Lösung die spezifische Drehung von + 8,0° besitzt.

2. Versuchsreihe.

5. 50 ccm 40 proz. Zuckerlösung,
140 „ Wasser,
20 g Oberhefe Sinner,
10 ccm Methylglyoxallösung (= 1,0904 g Methylglyoxal).
Gesamtvolumen 214 ccm.

6. 50 ccm 40proz. Zuckerlösung,
150 „ Wasser,
20 g Oberhefe Sinner.

Gesamtvolumen 214 ccm.

7. 170 ccm Wasser,
20 g Hefe Sinner,
10 ccm der selben Methylglyoxallösung.

Gesamtvolumen 196 ccm.

8. 190 ccm Wasser,
10 „ der gleichen Methylglyoxallösung.

Nach 4 Tagen waren in Ansatz 5 und 6 der Zucker, und in Versuch 5 auch das Methylglyoxal vollkommen verschwunden, während es in Versuch 7 wiederum noch teilweise unangegriffen war. Mit Hilfe der p-Nitro-phenylosazon-Methode wurden in Ansatz 8, der die unspezifische Umwandlung anzeigt, noch 97 Proz., und in Versuch 7 bloß 37,8 Proz. des angewendeten Methylglyoxals gefunden.

Milchsäurebestimmungen.

In Ansatz 5 für 100 ccm	gef.:	0,516 g	Milchsäure
„ „ 6 „ 100 „	„	0,045 g	„
Als Differenz zwischen 5 und 6 für 100 ccm . .	gef.:	0,471 g	Milchsäure
oder im ganzen Ansatz (= 214 ccm)	„	1,008 g	„
	ber.:	1,363 g	„

Ausbeute 74 Proz. der Theorie.

3. Versuchsreihe.

9. 50 ccm 40proz. Rohrzuckerlösung,
110 „ Wasser,
30 g Oberhefe Sinner,
10 ccm Methylglyoxallösung (= 0,9126 g Methylglyoxal).

Gesamtvolumen 195 ccm.

10. 50 ccm 40proz. Rohrzuckerlösung,
120 „ Wasser,
30 g Oberhefe Sinner.

Gesamtvolumen 195 ccm.

11. 130 ccm Wasser,
60 g Oberhefe[1]),
10 ccm Methylglyoxallösung wie oben.
Gesamtvolumen 190 ccm.

12. 140 ccm Wasser,
60 g Hefe.
Gesamtvolumen 190 ccm.

13. 190 ccm Wasser,
10 „ der selben Methylglyoxallösung.
Gesamtvolumen 200 ccm.

Der Zucker in Versuch 9 und 10 und das Methylglyoxal in 9 und 11 waren mit der größeren Hefenmenge nach 2 Tagen vollständig verschwunden. Zu dieser Zeit wurden in Ansatz 13 noch 99 Proz. des angewandten Ketonaldehyds wiedergefunden. Nach Zentrifugieren der Hefenansätze wurden in der klaren und vom Alkohol völlig befreiten Flüssigkeit die Kupfer-Kalk-Fällungen vorgenommen und die Milchsäuremengen ermittelt.

In Ansatz 9 für 100 ccm	gef.:	0,505 g Milchsäure
„ „ 10 „ 100 „	„	0,026 g „
Als Differenz zwischen 9 und 10 für 100 ccm	gef.:	0,479 g Milchsäure.
Im ganzen Ansatz (195 ccm)	„	0,934 g „
	ber.:	1,141 g „

Ausbeute: 82 Proz. der Theorie.

In Ansatz 11 für 100 ccm	gef.:	0,351 g Milchsäure
„ „ 12 „ 100 „	„	0,016 g „
Als Differenz 11 — 12 für 100 ccm	gef.:	0,335 g Milchsäure.
Im ganzen Ansatz (190 ccm)	„	0,637 g „
	ber.:	1,141 g „

Ausbeute: 56 Proz. der Theorie.

B. Unterhefe Patzenhofer.

4. Versuchsreihe.

14. 50 ccm 40proz. Zuckerlösung,
140 „ Wasser,
20 g Unterhefe Patzenhofer,
10 ccm Methylglyoxallösung (= 1,0904 g Methylglyoxal).
Gesamtvolumen 214 ccm.

[1]) In den zuckerfreien Ansätzen wandten wir das doppelte Hefenquantum an.

15. 50 ccm 40proz. Zuckerlösung,
150 „ Wasser,
20 g Unterhefe Patzenhofer.
Gesamtvolumen 214 ccm.

16. 170 ccm Wasser,
20 g Hefe Patzenhofer,
10 ccm Methylglyoxallösung.
Gesamtvolumen 196 ccm.

17. 190 ccm Wasser,
10 „ Methylglyoxallösung.

Nach 5 Tagen war in Ansatz 14 Methylglyoxal nebst Zucker, in 15 der Zucker verbraucht, während in 16 noch ein Teil des Methylglyoxals unverändert geblieben war. Die Wägung des p-Nitro-phenylosazons ergab in diesem Ansatz einen Rest von 36,2 Proz. des ursprünglich zugefügten Ketonaldehyds und im Vergleichsversuch 17 noch 97 Proz., so daß also lediglich 3 Proz. Methylglyoxal unspezifisch verändert worden waren.

Milchsäuregehalt.

In Ansatz 14 für 100 ccm	gef.: 0,492 g	Milchsäure
„ „ 15 „ 100 „	„ 0,048 g	„
Als Differenz 14 — 15 für 100 ccm	gef.: 0,444 g	Milchsäure.
Im ganzen Ansatz (214 ccm)	„ 0,950 g	„
	ber.: 1,363 g	„

Ausbeute: 70 Proz. der Theorie.

5. Versuchsreihe.

18. 3 Liter Wasser,
350 g Zucker,
300 g Patzenhofer Hefe,
140 g Methylglyoxallösung (= 14,0938 g Methylglyoxal).
Gesamtvolumen 3,475 Liter.

19. 3,14 Liter Wasser,
350 g Zucker,
300 g Unterhefe.
Gesamtvolumen 3,475 Liter.

20. 95 ccm Wasser,
5 „ Methylglyoxallösung (= 0,503 35 g Ketonaldehyd).

Nach 3 Tagen war der Zucker in 18 und 19 vergoren und in 18 auch das Methylglyoxal verschwunden. Im fermentfreien Versuch 20 war zum Schluß noch das gesamte Methylglyoxal vorhanden.

Milchsäuregehalt.

In Ansatz 18 für 100 ccm	gef.:	0,400 g	Milchsäure
„ „ 19 „ 100 „	„	0,031 g	„
Als Differenz 18 — 19 für 100 ccm	gef.:	0,369 g	Milchsäure.
Im ganzen Ansatz (3,475 Liter)	„	12,822 g	„
	ber.:	17,617 g	„

Ausbeute: 73 Proz. der Theorie.

Isolierung von Zinklactat und Propylenglykol aus Ansatz 18.

3 Liter des Zentrifugats vom Ansatz 18 wurden mit 100 g Zinkcarbonat (alkalifrei) 2 Stunden im siedenden Wasserbade gekocht, abgesaugt, der Niederschlag gut nachgewaschen und das klare Filtrat mit etwas Zinkcarbonat im *Faust-Heim*schen Apparat zum Sirup eingeengt. Durch sorgfältiges wiederholtes Verreiben mit kaltem, absolutem Alkohol wurde das Propylenglykol ausgezogen, während der größte Teil des Zinklactats mit Verunreinigungen aus der Hefe als pulvriger Rückstand zurückblieb. Dieser unlösliche Anteil, durch Zentrifugieren abgetrennt, wurde in Wasser gelöst, mit H_3PO_4 gegen Kongo angesäuert und mit schwefelsaurem Ammoniak gesättigt; dann wurde wie zuvor (s. S. 477) die Milchsäure mit Äther extrahiert.

Der kalte alkoholische Auszug wurde im Vakuum verdampft. Der Rückstand war in absolutem Alkohol löslich. Es wurde das gleiche Volumen wasserfreien Äthers hinzugefügt, von dem entstandenen Niederschlag abfiltriert und gut nachgewaschen. Nach Eindampfen wurde die Auflösung in Alkohol und Fällung mit Äther wiederholt und so fort, bis das Residuum im Gemisch gleicher Teile absoluten Alkohols und Äthers klar löslich war.

Die vereinigten Niederschläge der Alkohol-Äther-Fällungen gaben noch ziemlich stark die Milchsäure-reaktion nach *Hopkins-Fletcher* und wurden deshalb nach der vorher angegebenen Vorbereitung mit Äther extrahiert. Aus den ätherischen Milchsäurelösungen wurden durch die S. 477 beschriebene Behandlung 18,5 g reines Zinksalz der d(—)-Milchsäure erhalten. Die Drehung einer 2,5 proz. Lösung des Rohprodukts im 2-dcm-Rohr betrug $\alpha = +0{,}39^0$; $[\alpha]_D = +7{,}8^0$. Somit war schon das Produkt des allerersten Kristallausfalls praktisch rein.

Nach Umkristallisation war $[\alpha]_D = +8{,}0^0$ ($\alpha = +0{,}40^0$, $l = 2$, $c = 2{,}5$).

0,1936 g lufttrockene Substanz gaben 0,0252 g H_2O ab.

0,1773 g lufttrockene Substanz lieferten 0,0517 g ZnO.

$Zn(C_3H_5O_3)_2 + 2\,H_2O$. Ber.: H_2O = 12,89 Proz.; ZnO = 29,14 Proz.
Gef.: H_2O = 13,01 „ ; ZnO = 29,16 „.

Die in Alkohol und Äther klar lösliche Portion wurde zu Sirup verdampft, in absolutem Alkohol aufgenommen, über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, vom Alkohol befreit und bei 12 mm fraktioniert.

Fraktion a) 90 bis 92°: 0,6737 g Propylenglykol und
,, b) 160°: 0,450 g unbekannte Substanz.

Im ganzen Ansatz von 3,475 Liter sind demnach 0,780 g Propylenglykol. Die Ausbeute am richtig siedenden α, β-Dioxypropan belief sich auf 5,24 Proz. der Theorie, die 14,88 g fordern würde, wenn alles Methylglyoxal phytochemisch zum Propylenglykol reduziert worden wäre.

Die 0,6737 g der Fraktion a) wurden in Wasser gelöst, auf 10,0 ccm aufgefüllt und polarisiert. Im 2-dcm-Rohr war $\alpha = -0,70^0$, also $[\alpha]_D = -5,2^0$.

Oxydation des Propylenglykols mit Brom-Soda.

In der Propylenglykol-lösung von der Polarisation, die auf 5 ccm konzentriert war, wurden 2,5 g kristallisierte Soda heiß gelöst; nach Abkühlung auf 5° setzten wir 0,35 ccm Brom auf einmal hinzu. Beim Umschütteln trat sofort fast gänzliche Entfärbung und Kohlensäureentwicklung ein, die nach etwa 40 Minuten beendet war. Nun wurde mit Salzsäure angesäuert, zur Entfärbung des frei gemachten Broms einige Blasen schwefliger Säure eingeleitet und schließlich mit Natronlauge neutralisiert.

Diese Flüssigkeit reduzierte *Fehling*sche Mischung sofort in der Kälte außerordentlich stark und gab beim Erhitzen mit p-Nitrophenylhydrazin-acetat das Methylglyoxal-p-nitro-phenylosazon, das nach Umkristallisation aus Pyridin-Essigsäure den richtigen Schmelzpunkt von 284° besaß.

6. Versuchsreihe.

21. 50 ccm 40proz. Zuckerlösung,
110 ,, Wasser,
30 g Unterhefe,
10 ccm Methylglyoxallösung (= 0,9126 g Methylglyoxal).
Gesamtvolumen 195 ccm.

22. 50 ccm 40proz. Zuckerlösung,
120 ,, Wasser,
30 g Unterhefe.
Gesamtvolumen 195 ccm.

23. 130 ccm Wasser,
60 g Hefe,
10 ccm Methylglyoxallösung.
Gesamtvolumen 190 ccm.

24. 140 ccm Wasser,
60 g Hefe.
Gesamtvolumen 190 ccm.

25. 190 ccm Wasser,
10 „ Methylglyoxallösung.
Gesamtvolumen 200 ccm.

In Versuch 23 war das Methylglyoxal bereits nach 24 Stunden verschwunden, in 21. Zucker nebst Methylglyoxal nach 46 Stunden.

Milchsäuregehalt.

In Ansatz 21 für 100 ccm	gef.:	0,490 g	Milchsäure
„ „ 22 „ 100 „	„	0,077 g	„
Als Differenz 21 — 22 für 100 ccm	gef.:	0,413 g	Milchsäure.
Im ganzen Ansatz (195 ccm)	„	0,805 g	„
	ber.:	1,141 g	„

Ausbeute 71 Proz. der Theorie.

In Ansatz 23 für 100 ccm	gef.:	0,350 g	Milchsäure
„ „ 24 „ 100 „	„	0,070 g	„
Als Differenz 23 — 24 für 100 ccm	gef.:	0,280 g	Milchsäure
Im ganzen Ansatz (190 ccm)	„	0,532 g	„
	ber.:	1,141 g	„

Ausbeute 47 Proz. der Theorie.

II. Versuche mit Trockenhefe aus Patzenhofer Unterhefe.

7. Versuchsreihe.

26. 50 ccm 20proz. Zuckerlösung,
140 „ Wasser,
25 g Trocken-Unterhefe,
10 ccm Methylglyoxallösung (= 1,1252 g Ketonaldehyd).
2 „ Toluol.
Gesamtvolumen 210 ccm.

27. 50 ccm 20proz. Zuckerlösung,
150 „ Wasser,
25 g Trockenhefe,
2 ccm Toluol.
Gesamtvolumen 210 ccm.

28. 190 ccm Wasser,
25 g Trockenhefe,
10 ccm obiger Methylglyoxallösung,
2 „ Toluol.
Gesamtvolumen 210 ccm.

29. 200 ccm Wasser,
25 g Trockenhefe,
2 ccm Toluol.

Gesamtvolumen 210 ccm.

30. 100 ccm Wasser,
5 „ der gleichen Methylglyoxallösung.
1 „ Toluol.

Gesamtvolumen 105 ccm.

Die Osazonproben auf Methylglyoxal und die Reduktionsversu[…] mit *Fehling*scher Lösung mußten in den Ansätzen mit Trockenh[…] und ebenso bei Saft (s. S. 485) selbstverständlich in koagulierten […] klar zentrifugierten Anteilen vorgenommen werden. Bereits n[…] 3 Stunden war in Ansatz 26 und 27 kein Methylglyoxal mehr v[…] handen; unbeschadet des noch unvergorenen Zuckers wurde der Mil[…] säuregehalt ermittelt. Zur Entfernung der Kohlenhydrate mußte […] diesen Versuchen natürlich eine erheblich größere Menge Kupfer-K[…] angewendet werden als für gewöhnlich.

Zur Eiweißfällung wurde nach *Schenk* zu dem nicht koagulierte[…] Ansatz die gleiche Menge einer 4proz., mit Kochsalz gesättigten Sal[…] säure und die doppelte Menge 5proz. Sublimats zugegeben. Nach d[…] Entquecksilberung wurde der Alkohol durch dreimaliges Eindampfe[…] entfernt und dann die Kupfer-Kalk-Fällung vorgenommen.

Milchsäuregehalt.

In Ansatz 26 für 100 ccm	gef.:	0,630 g	Milchsäu[…]
„ „ 27 „ 100 „	„	0,115 g	„
Als Differenz 26 — 27 für 100 ccm	gef.:	0,515 g	Milchsäu[…]
Im ganzen Ansatz (210 ccm)	„	1,082 g	„
	ber.:	1,406 g	„

Ausbeute 77 Proz. der Theorie.

In Ansatz 28 für 100 ccm	gef.:	0,477 g	Milchsä[…]
„ „ 29 „ 100 „	„	0,064 g	„
Als Differenz 28 — 29 für 100 ccm	gef.:	0,413 g	Milchsä[…]
Im ganzen Ansatz (210 ccm)	„	0,867 g	„
	ber.:	1,406 g	„

Ausbeute 62 Proz. der Theorie.

Bei Wiederholung der Versuche dieser Serie in genau gleich[…] Anordnung, jedoch mit einer anderen Trocken-Unterhefe, fanden […]

zuckerhaltigen Ansatz eine Ausbeute an Milchsäure von 71 Proz. l im zuckerfreien Versuch eine Ausbeute von 66 Proz.

Das Zinksalz selbst war mindestens zu 95 Proz. reines d(—)-tat, enthielt also wohl eine Spur Racemat.

III. Versuche mit Hefenmazerationssaft aus Patzenhofer Unterhefe.

8. Versuchsreihe.

31. 200 ccm Mazerationssaft nach *von Lebedew*,
10 g Zucker,
10 ccm Methylglyoxallösung (= 1,1252 g Ketonaldehyd),
5 ,, Wasser,
2 ,, Toluol.
Gesamtvolumen 220 ccm.

32. 200 ccm Saft,
10 g Zucker,
15 ccm Wasser,
2 ,, Toluol.
Gesamtvolumen 220 ccm.

33. 200 ccm Saft,
10 ,, der gleichen Methylglyoxallösung,
10 ,, Wasser,
2 ,, Toluol.
Gesamtvolumen 220 ccm.

34. 200 ccm Saft,
20 ,, Wasser,
2 ,, Toluol.
Gesamtvolumen 220 ccm.

35. 105 ccm Wasser,
5 ,, von eben derselben Methylglyoxallösung,
1 ,, Toluol.
Gesamtvolumen 110 ccm.

In dieser Versuchsreihe war nach 2½ Stunden sämtliches Methylyoxal bereits verschwunden. Die Vorbereitungen zu den Milchsäurestimmungen waren die gleichen wie bei den Trockenhefen-Versuchen . S. 484).

n Ansatz 31 für 100 ccm	gef.:	0,656 g	Milchsäure
,, 32 ,, 100 ,, ...	,,	0,175 g	,,
ls Differenz 31 — 32 für 100 ccm	gef.:	0,481 g	Milchsäure.
n ganzen Ansatz (220 ccm)	,,	1,058 g	,,
	ber.:	1,406 g	,,

Ausbeute 75 Proz. der Theorie.

In Ansatz 33 für 100 ccm . . . . gef.: 0,631 g Milchsäure
,, ,, 34 ,, 100 ,, ... ,, 0,162 g ,,

Als Differenz 33 — 34 für 100 ccm . . . . gef.: 0,469 g Milchsäure.
Im ganzen Ansatz (220 ccm) . . . . ,, 1,031 g ,,
ber.: 1,406 g ,,

Ausbeute 73 Proz. der Theorie.

9. Versuchsreihe.

36. 3 Liter Mazerationssaft,
300 g Zucker,
150 ccm Methylglyoxallösung (= 15,594 g Ketonaldehyd),
30 ,, Toluol.
Gesamtvolumen 3300 ccm.

37. 1 Liter Saft,
100 g Zucker,
50 ccm Wasser,
10 ,, Toluol.
Gesamtvolumen 1100 ccm.

38. 1 Liter Saft,
50 ccm Methylglyoxallösung (5.198 g Methylglyoxal),
10 ,, Toluol.
Gesamtvolumen 1050 ccm.

39. 1 Liter Saft,
25 ccm Wasser,
25 ,, der selben Methylglyoxallösung (= 2,599 g Ketonaldehyd),
10 ,, Toluol.
Gesamtvolumen 1050 ccm.

40. 500 ccm Saft,
25 ,, Wasser,
5 ,, Toluol.
Gesamtvolumen 525 ccm.

41. 95 ccm Wasser,
5 ,, Methylglyoxallösung,
1 ,, Toluol.
Gesamtvolumen 100 ccm.

Bereits nach 1½ Stunden war in 39 kein Methylglyoxal mehr nachzuweisen und nach 3 Stunden war es auch in den anderen Saftansätzen nicht mehr zu entdecken. Nach dieser Zeit war in der Kontrollprobe 41 der Methylglyoxalgehalt ganz unverändert.

Milchsäuregehalt.

In Ansatz 36 für 100 ccm	gef.:	0,821 g	Milchsäure
,, ,, 37 ,, 100 ,, ...	,,	0,300 g	,,
Als Differenz 36 — 37 für 100 ccm	gef.:	0,521 g	Milchsäure.
Im ganzen Ansatz (3300 ccm)	,,	17,193 g	,,
	ber.:	19,493 g	,,

Ausbeute 88 Proz. der Theorie.

In Ansatz 38 für 100 ccm	gef.:	0,713 g	Milchsäure
,, ,, 40 ,, 100 ,, ...	,,	0,306 g	,,
Als Differenz 38 — 40 für 100 ccm	gef.:	0,407 g	Milchsäure.
Im ganzen Ansatz (1050 ccm)	,,	4,274 g	,,
	ber.:	6,498 g	,,

Ausbeute 66 Proz. der Theorie.

In Ansatz 39 für 100 ccm	gef.:	0,559 g	Milchsäure
,, ,, 40 ,, 100 ,, ...	,,	0,306 g	,,
Als Differenz 39 — 40 für 100 ccm	gef.:	0,253 g	Milchsäure.
Im ganzen Ansatz (1050 ccm)	,,	2,657 g	,,
	ber.:	3,249 g	,,

Ausbeute 82 Proz. der Theorie.

Der Ertrag war also in der dünneren, schnell enzymatisch umgesetzten Methylglyoxallösung etwas höher.

Das aus Ansatz 36 isolierte Zinksalz war optisch inaktiv[1]). Daß tatsächlich das Racemat vorlag, zeigte auch die Bestimmung des Kristallwassers und der Asche.

0,1808 g lufttrockenes Salz gaben 0,0333 g H_2O ab.

0,1826 g lufttrockenes Salz lieferten 0,0505 g ZnO.

$Zn(C_3H_5O_3)_2 + 3H_2O$. Ber.: H_2O = 18,18 Proz.; ZnO = 27,35 Proz.
Gef.: H_2O = 18,42 ,, ; ZnO = 27,65 ,,

[1]) Die Mutterlauge war ganz minimal dextrogyr.

Berichtigung

zu der Arbeit: Über individuelle Verschiedenheiten des isoelektrischen Punktes beim Frauenmilchcasein, von *F. Trendtel*, diese Zeitschr. **180**, 371 bis 376, 1927.

In Versuchsreihe II (S. 373 bis 374) ist zu lesen:

(Nicht umgefälltes Casein) statt (Nicht umgefülltes Casein).

Autorenverzeichnis.



Biochemische Zeitschrift

Unter Mitwirkung von

herausgegeben von

C. Neuberg-Berlin

Hundertdreiundachtzigster Band



Berlin
Verlag von Julius Springer
1927

Druck von Friedr. Vieweg & Sohn Akt.-Ges., Braunschweig

Inhalt.

Urease. I.

Von

Hans v. Euler und Edvard Brunius.

(Aus dem biochemischen Laboratorium der Universität Stockholm.)

(Eingegangen am 7. Januar 1927.)

I. Theoretischer Teil.

Das Enzym Urease, dessen Wirkung auf das wohldefinierte Substrat Harnstoff nach der Bruttoformel

$$H_2N \cdot CO \cdot NH_2 + H_2O = CO_2 + 2\,NH_3$$

besonders einfach zu sein scheint, ist sowohl hinsichtlich seiner biologischen Rolle als hinsichtlich seiner chemischen Leistung und seiner Kinetik noch ungenügend aufgeklärt.

Der obigen Formel nach schien sich die Urease zunächst den proteolytischen Enzymen anzuschließen, indem an Stelle der zu spaltenden Gruppe $.CO.NH.$ hier die reine Säureamidgruppe, $.CO.NH_2$, tritt. In diesem Falle würde sich die enzymatische Harnstoffspaltung immerhin aus zwei Vorgängen zusammensetzen, nämlich aus der Hydrolyse des Diamids $H_2N.CO.NH_2$ in carbaminsaures Ammonium und einer nachfolgenden Spaltung des letzteren Salzes in Ammoniumcarbonat bzw. in CO_2 und $2\,NH_3$. Es blieb zu entscheiden, wie die beiden Teilvorgänge die Gesamtreaktion beeinflussen bzw. ob überhaupt die Spaltung des carbaminsauren Ammoniums eine enzymatische Reaktion ist, oder ob sie — was bei der Labilität[1]) der carbaminsauren Salze nicht unwahrscheinlich ist — ohne Mitwirkung eines Enzyms verläuft.

Schon die Untersuchung von *Yamasaki*[2]) stützte die Annahme, daß bei der Spaltung des Harnstoffs Carbamat als Zwischenprodukt auftritt; nach seinen Versuchen erreicht die Carbamatkonzentration

---

[1]) Siehe hierzu *Faurholt*, Zeitschr. f. anorg. Chem. **120**, 85, 1921.

[2]) *Yamasaki*, Sc. Reports Tohoku Univ. **9**, 97, 1920.

im Verlauf der Harnstoffspaltung ein Maximum und nimmt dann wieder ab. Demgemäß ist zu schließen, daß die Teilreaktion

Harnstoff → Ammoniumcarbamat

diejenige ist, welche von der Urease beschleunigt wird, und dieser Schluß wird durch die eingehenden Untersuchungen von *Mack* und *Villars*[1]) bestätigt.

Es macht sich aber hinsichtlich der Kinetik der enzymatischen Harnstoffspaltung noch eine zweite Komplikation geltend, welche mit dem Auftreten isomerer Harnstoff-Formen zusammenhängt.

Bekanntlich haben *Armstrong* und *Horton*[2]) sowie *E. A. Werner*[3]) asymmetrische Formeln für den Harnstoff vorgeschlagen, nämlich

$$HN:C\begin{matrix}\diagup OH \\ \diagdown NH_2\end{matrix} \quad \text{bzw.} \quad HN:C\begin{matrix}\diagup O \\ \mid \\ \diagdown NH_3\end{matrix} .$$

Dadurch tritt die Analogie des Harnstoffs zu den Peptiden, überhaupt zu den Derivaten der Carbamidgruppe, . CO . NH ., zurück.

Nachdem *Fawsitt*[4]) nachgewiesen hatte, daß die katalytische Hydrolyse des Harnstoffs durch Säuren und Basen über das Zwischenprodukt Ammoniumcyanat verläuft, geht aus den neueren Versuchen von *Fearon*[5]) sowie von *Mack* und *Villars* hervor, daß auch bei der enzymatischen Harnstoffspaltung Cyansäure auftritt.

Die Kinetik der Ureasewirkung kann natürlich nicht als endgültig aufgeklärt angesehen werden, bevor nicht die Gesamtreaktion als Funktion der Teilvorgänge berechnet werden kann.

Immerhin sind wir durch die früheren kinetischen Untersuchungen, von denen insbesondere diejenigen von *D. D. van Slyke*[6]) erwähnt seien, über den zeitlichen Verlauf der Enzymreaktion und über die Konzentrationsfunktionen so weit unterrichtet, daß wir für die Bestimmung der Wirksamkeit von Ureasepräparaten sichere Grundlagen besitzen. Wir wissen, daß innerhalb gewisser Grenzen aus Harnstoff Ammoniak nach der Formel für monomolekulare Reaktionen gebildet wird.

---

1) *Mack* und *Villars*, Journ. Amer. Chem. Soc. **45**, 505, 1923.

2) *Armstrong* und *Horton*, Proc. Roy. Soc. **85**, 109, 1912.

3) *E. A. Werner*, Journ. Chem. Soc. **103**, 1010 und 2275, 1913, siehe ferner die Monographie dieses Autors: Chemistry of urea. London 1923.

4) *Fawsitt*, Zeitschr. f. physik. Chem. **41**, 601, 1902; *Burrows* und *Fawsitt*, Journ. Chem. Soc. **105**, 609, 1914.

5) *Fearon*, Biochem. Journ. **17**, 84, 1923.

6) *D. D. van Slyke*, Journ. Biol. Chem. **19**, 414, 1914. *D. D. van Slyke* und *Cullen*, ebendaselbst **24**, 117, 1916; *D. D. van Slyke* und *Zacharias*, ebendaselbst **19**, 181, 1914.

Ferner wissen wir aus den Arbeiten von *van Slyke*, *Barendrecht*[1]), *Rona* und *György*[2]), *St. Lövgren*[3]) u. a., daß die enzymatische Harnstoffspaltung nahe bei $p_H = 7$ ein Aciditätsoptimum besitzt.

Über die Salzwirkungen sowie über die Wirkung von Ampholyten liegt eine Reihe von Untersuchungen von *Onodera*, *Groll*[4]), *Jacoby*[5]), *Rona*, *Wester*[6]), *Kochmann*[7]), *Kato* u. a. vor, nach deren Ergebnissen die erforderliche Pufferung zweckmäßig gewählt werden kann.

Trotz dieser vielfachen und eingehenden Forschungen reicht das vorhandene experimentelle Material noch kaum aus, um in den Chemismus der Ureasewirkung einzudringen[8]). Insbesondere fehlen uns noch die Grundlagen für die Beurteilung, welche Gruppe des Substrats seine Bindung der Urease vermittelt. Auf Grund früherer Versuche aus diesem Laboratorium haben *Euler* und *Josephson* die Affinitätskonstante

$$K_M = \frac{[\text{Enzym-Substrat}]}{[\text{Enzym}] \, . \, [\text{Substrat}]}$$

zu berechnen versucht, und haben vorläufig den Wert 90 angegeben. Die Sicherstellung dieses Wertes für K_M erscheint uns von allgemeinem, enzymchemischem Interesse, um so mehr, als die einfache Zusammensetzung des Substrats und der Reaktionsprodukte die Zahl der in Betracht kommenden Gruppen beschränkt.

Versuche von *Josephson* und *Euler*[9]) an Darmpeptidase haben es wahrscheinlich gemacht, daß die Bindung des Enzyms nicht, wie bei den Disacchariden angenommen wurde, an zwei Affinitätsstellen erfolgt, sondern daß eine einzige spezifische Gruppe im wesentlichen die Größe der Konstanten K_M bedingt[10]). Wie eine noch nicht veröffentlichte Berechnung ergab, ist im System Darmpeptidase—Glycylglycin—Glykokoll die Affinität des Enzyms zum Glykokoll nicht wesentlich kleiner als diejenige zum Dipeptid. Eine entsprechende

---

[1]) *Barendrecht*, Rec. Trav. Chem. Pays-Bas **39**, 1, 1920.
[2]) *Rona* und *György*, diese Zeitschr. **111**, 115, 1920.
[3]) *St. Lövgren*, ebendaselbst **119**, 215, 1921; **137**, 206, 1923.
[4]) *Groll*, Proc. Akad. v. Wetensch. Amsterdam **20**, 559, 1917/18.
[5]) *Jacoby* und Mitarbeiter, diese Zeitschr. **140—158**, 1923—1925.
[6]) *Wester*, ebendaselbst **128**, 279, 1922.
[7]) *Kochmann*, ebendaselbst **151**, 259, 1924.
[8]) In Oppenheimer-Kuhns Handbuch „Die Fermente und ihre Wirkungen“, 5. Aufl., ist eine von *Sture Lövgren* (diese Zeitschr. **137**, 206, 233, 1925) aufgestellte Formel aufgenommen. Dieselbe ist sogar in das „Lehrbuch der Enzyme“ der gleichen Verfasser übergegangen. Ohne auf die Herleitung der Formel einzugehen, möchten wir hier nur betonen, daß wir in diesem rein formalen Ausdruck keinen Fortschritt erblicken.
[9]) *Josephson* und *Euler*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **162**, 85, 1926.
[10]) Siehe *Euler*, Chem. d. Enzyme, 3. Aufl., I. Teil, 152, 1925.

Feststellung bei der Urease erscheint uns um so wichtiger, als die Reversibilität der Ureasewirkung, also die enzymatische Synthese des Harnstoffs, aus den Spaltprodukten nach den Angaben von *Barendrecht* und insbesondere von *Mack* und *Villars* durchgeführt zu sein scheint.

Die Bedingungen der enzymatischen Harnstoffsynthese sind von biologischen Gesichtspunkten aus in letzter Zeit besonders von *N. N. Iwanoff*[1]) sehr erfolgreich studiert worden. Der Anschluß seiner an lebenden Organismen gewonnenen Ergebnisse an die in einfacheren Systemen berechenbaren Gleichgewichte verspricht Aufschluß über manche biochemischen Fragen, welche über das Gebiet dieser speziellen Synthese hinausgehen.

Ein näheres Studium der Verbindung Harnstoff—Urease haben wir aber nicht in Angriff nehmen wollen, ohne im Besitz wesentlich reinerer Enzymlösungen zu sein als diejenigen, mit welchen bisher gearbeitet wurde.

Bei den vorliegenden orientierenden Versuchen haben wir uns zunächst durch eigene Versuche davon überzeugt, daß ein spezifischer Aktivator im Sinne *Onoderas* in Ureaselösungen, wie sie aus pflanzlichem Material gewonnen werden, *nicht* vorkommt. Für die Bestimmung der enzymatischen Wirksamkeit von Präparaten war die Entscheidung dieser Frage natürlich unbedingt notwendig.

Die hier mitzuteilenden orientierenden Versuche zur Reinigung und Anreicherung der Urease in Lösung haben wir mit dem Studium der Kaolin- und Tonerdeadsorption und der Dialyse begonnen. Auch Versuche, welche sich auf die fraktionierte Fällung bzw. auf fraktionierte Kristallisation aus organischen Lösungsmitteln und Lösungsmittelgemischen gründen, haben wir angestellt, haben aber bisher die Erfolge, welche *Sumner* in vorläufigen Mitteilungen beschreibt, nicht erzielen können[2]).

II. Methodik.

Die Spaltung des Harnstoffs in Kohlensäure und Ammoniak wird am besten so verfolgt, daß die zu verschiedenen Zeiten entwickelten

---

[1]) *N. N. Iwanoff*, diese Zeitschr. **135**, 1, 1923; **143**, 62, 1923; **154**, 376 und 391, 1924; **157**, 229, 1925.

[2]) *Sumner*, Journ. biol. Chem. **69**, 435, 1926; *Sumner* und *V. A. Graham*, Proc. Soc. exper. biol. a. med. **22**, 504, 1925.

Auch durch die von *Sumner* vorgeschlagene Fällung mit Bleiacetat und mit neutralisierter Cadmiumchloridlösung haben wir bisher nur sehr unbefriedigende Ausbeuten erzielt, in keinem Falle mehr als 10 Proz. Als Elutionsmittel wurde bei diesen Versuchen 1proz. Kaliumoxalatlösung verwendet.

Ammoniakmengen bestimmt werden. Zu diesem Zwecke wurde die von *Folin* angegebene Ausblasemethode verwendet. Nach dieser wird ein Luftstrom durch die Probe geleitet, nachdem derselbe mit Alkali (Kalium-Carbonatlösung) versetzt ist, und die Luft streicht dann durch eine mit n/10 H_2SO_4 gefüllte Vorlage. Die Säure wird dann mit n/10 NaOH und Methylrot als Indikator titriert. Bei Zimmertemperatur ist zum vollständigen Ausblasen eine Zeit von 15 bis 20 Stunden erforderlich, bei 40° aber sind 1 bis 2 Stunden schon hinreichend. Bei diesen Versuchen wurde als Alkalizusatz eine 50proz. Kaliumcarbonatlösung, 40 ccm, zu der Probe zugesetzt. In dem Kolben, in welchem ausgeblasen wurde, betrug das Totalvolumen 60 ccm, das der Vorlage 200 ccm. Der Luftstrom wurde in konzentrierter Schwefelsäure gewaschen, um ihn ganz von Ammoniakspuren zu befreien.

Folgender Versuch zeigt uns die Anwendbarkeit der Methode.

Angewandt	2,00	5,00	10,00 ccm	NH_4Cl-Lösung.
	2,06	5,19	10,30 „	n/10 NH_3.

Einer *Kjeldahl*-Bestimmung zufolge enthielten 5 ccm der verwendeten Ammoniumchloridlösung 5,16 ccm n/10 NH_3, in guter Übereinstimmung mit den obigen Werten.

Wieviel Harnstoff bei der *Folin*-Methode gespalten wird, haben wir durch folgenden Versuch festgestellt, bei welchem die Temperatur während des Blasens bei 40° gehalten wurde. Zusatz 40 ccm K_2CO_3-Lösung.

0,2 n Harnstoff ccm	0,1 n NH_3 ccm	Spaltung Proz.
5,00	0,17	0,8
10,00	0,20	0,5
15,00	0,30	0,5

Der Harnstoff wird also bei der *Folin*-Methode zu einem gewissen Grade gespalten. Indessen ist es leicht, hierfür eine Korrektion anzubringen, die durch eine jedesmal auszuführende Parallelprobe zu ermitteln ist. Die Ammoniakmenge, welche bei der Parallelprobe auftritt, entspricht den Ammoniakmengen, welche durch Spaltung bei Blasen entstehen.

Die Konzentration der Wasserstoffionen kann nicht elektrometrisch mit Wasserstoffelektroden in Gegenwart von Ammoniak gemessen werden. Dagegen scheint sich die Chinhydronmethode von *Biilmann* zur Bestimmung von p_H in diesem Falle zu eignen. Durch mehrere Versuche haben wir uns überzeugt, daß Gegenwart von Ammoniak bei $p_H < 8,2$ die Ergebnisse der *Biilmann*schen Methode nicht stört.



III. Experimenteller Teil.

A. Vorversuche.

Aktivität eines Arlco-Ureasepräparats.

Dieses Präparat wird aus Jackbohnen dargestellt. In 25 ccm Wasser wurden 0,5 g des Präparats gelöst; Trockengewicht in 5 ccm war 0,0931 g. Die Reaktionsmischungen waren folgendermaßen zusammengesetzt:

20 ccm 1 mol. Harnstofflösung + 50 ccm 1 mol. Phosphatmischung + 10 ccm Enzymlösung + 20 ccm Wasser. Gesamtvolumen somit 100 ccm Harnstoffkonzentration in den Mischungen somit 0,2 mol.

Die Phosphatmischungen wurden aus primärem und sekundärem Kaliumphosphat bereitet und hatten eine Acidität $p_H = 7{,}30$.

Zu den Ammoniakbestimmungen wurden je 10 ccm entnommen und in 10 ccm 0,5 n H_2SO_4 einpipettiert, wodurch die Enzymreaktion gehemmt wurde. Die Nullprobe wurde so ausgeführt, daß zu den Zeiten 1, 5, 10 usw. Minuten Proben genommen wurden; sie wurden in eine Kurve eingetragen und der Wert für die Zeit 0 wurde extrapoliert. Der Wert, welcher dann erhalten wird, wird von den folgenden subtrahiert.

Min.	n/10 NH_3 ccm	Spaltung Proz.	$k \cdot 10^4$	p_H
5	1,46	—	32,3	7,33
10	2,85	—	32,2	—
15	4,37	10,9	33,4	7,44
20	5,72	—	33,5	—
25	7,05	17,6	33,6	7,54

Wie die vierte Spalte der Tabelle zeigt, verläuft die Reaktion sehr angenähert monomolekular[1]).

Setzt man $k = 32 \cdot 10^{-4}$, so wird $Uf = \dfrac{k \cdot \text{g Substrat}}{g \text{ Enzympräparat}} = 0{,}026.$

Aktivitätsbestimmungen an Sojabohnenextrakt.

Feingemahlene Sojabohnen wurden mit der zehnfachen Menge Wasser 3 Stunden lang digeriert; hierauf wurde zentrifugiert. Trockengewicht in 5 ccm der Enzymlösung: 0,1375 g. Reaktionsmischung wie im vorigen Versuch. Mittel der Reaktionskonstanten: $20 \cdot 10^{-4}$. Daraus $Uf = 0{,}009$.

Aktivitätsbestimmung am acetongefällten Extrakt.

100 g feingemahlene Sojabohnen wurden mit 500 ccm Wasser 8 Stunden lang behandelt. Hierauf wurde zentrifugiert; die Lösung wurde mit dem dreifachen Volumen Aceton gefällt, wobei ein flockiger, leicht zentrifugierbarer Niederschlag entstand. Dieser wurde mit Alkohol und Äther behandelt und im Vakuumexsikkator getrocknet; Ausbeute etwa 15 g.

0,5 g dieses Präparats in 20 ccm Wasser gelöst; Trockengewicht in 5 ccm 0,1075 g. Die gleiche Reaktionsmischung wie oben. Mittel der Reaktionskonstanten: $k = 24 \cdot 10^{-4}$. Daraus $Uf = 0{,}013$.

[1]) Über die Unabhängigkeit der Konstanten von einem Coenzym siehe S. 4.



B. Versuche über das Vorkommen einer Co-Urease.

Onodera[1]) fand, daß eine Ureaselösung bei der Dialyse ihre Aktivität allmählich ganz verliert. Eine 1,5proz. Ureaselösung, welche vor der Dialyse während 16,5 Stunden 23,19 ccm n/10 NH_3 entwickelt, gibt nach fünftägiger Dialyse nur 0,08 ccm n/10 NH_3 während der gleichen Zeit. Diese Verringerung der Aktivität führt *Onodera* auf den Verlust eines Coenzyms zurück. Dieses Coenzym hat sich jedoch im Dialysat nicht nachweisen lassen. *Onodera* führte die Dialyse mit Pergamentpapier als Membran aus. Einen entsprechenden Versuch führten wir mit Kollodiummembranen durch.

20 g fettfreien Sojabohnenpulvers wurden mit 150 ccm Wasser 1 Stunde lang geschüttelt. Hierauf wurde zentrifugiert; die so erhaltene Enzymlösung wurde auf zwei Kollodiumsäcke verteilt, welche 75 Stunden in je 150 ccm Wasser zur Dialyse gestellt wurden. Dabei war sowohl die Außen- wie die Innenflüssigkeit mit Toluol versetzt. Das Dialysat wurde bei 35^0 im Vakuum auf 10 ccm eingeengt. Die Innenflüssigkeit bei der Dialyse = 1; das im Vakuum eingeengte Dialysat wird mit y bezeichnet.

Es wurde nun folgender Versuch angestellt.

25 ccm 1 mol. Phosphatmischung + 10 ccm 1 mol. Harnstofflösung + 5 ccm y + 10 ccm H_2O. Acidität $p_H = 7{,}3$ (Chinhydronelektrode).

Aus der Reaktionsmischung werden nach verschiedenen Zeiten Proben von je 10 ccm in 10 ccm n/2 Schwefelsäure einpipettiert. Das gebildete Ammoniak wurde durch *Folin*-Blasen bestimmt, wobei 40 ccm 50proz. Kaliumcarbonatlösung zugesetzt wurden. In der Vorlage n/10 Schwefelsäure. Rücktitration mit n/10 NaOH.

In dieser Reaktionsmischung konnte keine Ammoniakbildung konstatiert werden.

Unsere hier nicht wiedergegebenen Versuchszahlen zeigen, daß durch Zusatz von dialysiertem Enzym keine Aktivierung eintritt. Temperatur bei diesen drei Versuchen 18^0. Das gleiche negative Resultat wurde mit dialysierter Arlco-Urease erhalten.

Nun wurde untersucht, ob eine auf 80^0 erhitzte Ureaselösung aktiviert. Eine Lösung von 2 g Arlco-Urease in 50 ccm Wasser wurde 70 Stunden lang gegen eine große Wassermenge dialysiert, welche mehrmals gewechselt wurde. Je 1 g Arlco-Urease, gelöst in 10 ccm Wasser, wurde unter Umrühren zu 40 ccm Wasser zugesetzt und auf 80^0 während 30 Minuten gehalten.

Die Versuche, die wir der Raumersparnis wegen nicht ausführlich angeben, zeigten, daß eine Aktivierung durch die erhitzte Enzymlösung

[1]) *Onodera*, Biochem. Journ. 9, 575, 1915.

sehr wahrscheinlich nicht eingetreten war. Die kleine Erhöhung der Aktivität lag fast innerhalb der Versuchsfehler.

Ebensowenig konnte eine Coenzymwirkung nachgewiesen werden. als die Ureaselösung statt auf 80⁰ etwa 10 Sekunden auf 100⁰ erhitzt wurde.

Diese Versuche zeigen also, daß im Dialysat kein Coenzym nachgewiesen werden kann. Dies steht auch in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von *Onodera*. Dagegen sollte nach *Onodera* in einer nicht dialysierten Ureaselösung Coenzym vorkommen. Er findet, daß bei Zusatz von 1 ccm 5proz. frischer Ureaselösung zu 5 ccm einer 5 Tage lang dialysierten 1,5proz. Ureaselösung diese Enzymmischung 8,53 ccm n/10 NH_3 während 16,5 Stunden entwickelt, während 5 ccm dialysiertes Enzym für sich allein 0,08 ccm und 1 ccm frische Enzymlösung 1,23 ccm entwickeln.

Dies wurde durch folgenden Versuch geprüft: Eine frische Enzymlösung wurde erhalten durch Auflösen von 0,3 g Arlco-Urease in 15 ccm Wasser. Eine Lösung von 2 g Urease in 50 ccm Wasser wurde 5 Tage lang gegen eine große, täglich erneuerte Wassermenge dialysiert.

1. 25 ccm 1 mol. Phosphatmischung + 10 ccm 1 mol. Harnstofflösung + 3 ccm dialysiertes Enzym + 12 ccm Wasser.

2. 25 ccm Phosphatmischung + 10 ccm 1 mol. Harnstofflösung + 5 ccm frische Enzymlösung + 10 ccm Wasser.

3. 25 ccm Phosphatmischung + 10 ccm 1 mol. Harnstofflösung + 3 ccm dialysiertes Enzym + 5 ccm frische Enzymlösung + 7 ccm Wasser.

Addiert man die Aktivitäten in 1 und 2, so erhält man 0,232 ccm 0,1 n NH_3 pro Minute. In Versuch 3 ergibt sich 0,242 ccm n/10 NH_3 pro Minute. Die Aktivitätssteigerung ist also nicht größer als 4,3 Proz. und im Vergleich zu dem von *Onodera* erhaltenen Effekt unbedeutend.

Eine Ureaselösung wird durch Erhitzen auf 100⁰ augenblicklich inaktiviert. Dies beruht nach *Onodera* darauf, daß die Co-Urease zerstört wird, und folglich fand er bei Zusatz von frischer Enzymlösung eine starke Aktivitätserhöhung. Auch dieser Effekt wurde durch einen Kontrollversuch geprüft.

0,5 g Arlco-Urease wurden in 25 ccm Wasser gelöst. Davon wurden 15 ccm einen Augenblick zum Kochen erhitzt.

Drei Versuche wurden angestellt mit je 25 ccm Phosphatmischung und 50 ccm Totalvolumen.

1.	2.	3.
+ 10 ccm zum Kochen erhitzte Enzymlösung + 5 ccm Wasser	+ 3 ccm frische Enzymlösung + 12 ccm Wasser	+ 3 ccm frische Enzymlösung + 10 ccm zum Kochen erhitzte Enzymlösung + 2 ccm Wasser

Das Ergebnis dieser Versuchsreihe war also negativ; der Effekt *Onoderas* wurde nicht gefunden.

C. Reinigungsversuche.

Auch hier wurde als Ausgangsmaterial das Präparat „Arlco-Urease" verwendet. Die Aktivität desselben, *Uf*, wurde durch folgenden Versuch ermittelt, und zwar mit 2proz. Enzymlösung.

Min.	n/10 NH_3 ccm	$k \cdot 10^4$
10	2,52	28,3
20	5,06	29,3
30	7,60	30,5
		Mittel: 29,4

Trockengewicht in 5 ccm = 0,0945 g.

$$Uf = \frac{0{,}002\,94 \cdot 0{,}6}{0{,}0945} = 0{,}019.$$

Adsorptionsversuche mit Kaolin.

Zu 50 ccm 2proz. Enzymlösung wurden 25 ccm Kaolinsuspension (Trockengewicht pro Kubikzentimeter 0,195 g) zugesetzt. Hierauf wurde zentrifugiert. Als Elutionsmittel wurde Sodalösung verwendet, von welcher so viel zugesetzt wurde, daß die Elutionslösung Phenolphthalein rot färbte. Hierauf wurde das Volumen auf 50 ccm ergänzt und die Mischung durch einen *Büchner*-Trichter filtriert. Neutralisation mit Essigsäure.

Min.	n/10 NH_3 ccm	$k \cdot 10^4$
10	0,33	3,5
20	0,57	3,1
30	0,90	3,3
		Mittel: 3,3

Ausbeute bei der Elution = 11 Proz. (berechnet nach der Aktivität des Ausgangsmaterials).

Hierauf wurde geprüft, ob durch Adsorption an Kaolin in Gegenwart von Essigsäure die Ausbeute erhöht werden konnte. Essigsäurekonzentration bei der Adsorption betrug 0,04 n. Im übrigen wurde wie beim vorhergehenden Versuch verfahren.

3 ccm Enzymlösung.

Min.	n/10 NH_3 ccm	$k \cdot 10^4$
10	0,88	9,7
20	1,62	9,0
30	2,47	9,2
		Mittel: 9,3

Ausbeute bei der Elution = 53 Proz.

Hierauf wurde die so erhaltene Enzymlösung gegen 2 Liter Wasser 15 Stunden lang im Eisschrank dialysiert.

5 ccm dialysierte Enzymlösung.

Min.	n/10 NH_3 ccm	$k \cdot 10^4$
10	0,73	7,9
20	1,43	7,8
30	2,19	8,1
		Mittel: 7,9

Aktivitätsverlust während der Dialyse = 49 Proz.
Trockengewicht in 5 ccm = 0,005 21 g.
Uf = 0,091.

Durch die Kaolinadsorption ist eine rund fünffache Steigerung der Wirksamkeit (*Uf*) erzielt worden.

Die Adsorption an Kaolin geschieht also geeigneter in essigsaurer Lösung bei p_H = etwa 2,7.

Adsorptionsversuche mit Aluminiumhydrat.

Durch Untersuchung des Ureasegehalts der Restlösung ergab sich, daß die Sorption an Aluminiumhydrat am besten durchgeführt wird, indem man die Ureaselösung direkt mit einer Tonerdesuspension versetzt, also bei einer Acidität, welche sich dabei von selbst einstellt.

Zu 50 ccm 2proz. Ureaselösung wurden 15 ccm Aluminiumhydratsuspension (Gramm Al_2O_3 pro Kubikzentimeter = 0,042) zugesetzt. Nach Abzentrifugieren wurde während 20 Minuten mit 1proz. Lösung von Dinatriumphosphat eluiert, worauf von neuem zentrifugiert wurde.

Aktivität vor der Dialyse (5 ccm Enzymlösung).

Min.	n/10 NH_3 ccm	$k \cdot 10^4$
30	2,38	8,9
60	4,79	9,2
90	7,20	9,6
		Mittel: 9,2

Ausbeute bei der Elution = 31 Proz.

Aktivität nach der 15stündigen Dialyse (5 ccm Enzymlösung.)

Min.	n/10 NH_3 ccm	$k \cdot 10^4$
30	1,10	4,0
60	2,28	4,2
90	3,37	4,2
		Mittel: 4,1

Trockengewicht in 5 ccm = 0,005 52 g. Uf = 0,045.

Die Wirksamkeit Uf ist also hier um das 2,4fache gestiegen.

Der geringe Wert dieser Steigerung des Reingehaltsgrades beruht nicht darauf, daß die Adsorption mit schlechter Ausbeute verläuft; der Gehalt der Restlösung an Urease war nämlich gering. Vielmehr beruht das ungenügende Resultat darauf, daß das Enzym sich nur unvollständig eluieren ließ. Es wurden auch Versuche ausgeführt zu Elusion mit Phosphat von verschiedener Acidität in den Grenzen $p_H = 5$ bis 9, ohne daß aber ein besseres Resultat erzielt werden konnte.

D. Adsorptionsversuche mit neuem Ausgangsmaterial (Areco-Urease).

Dieses Präparat zeigte eine größere Aktivität als das zuerst verwendete; es übertrifft letzteres um das 3,6fache.

An einer 0,5 proz. Lösung wurde folgender Versuch angestellt (5 ccm Enzymlösung).

Min.	n/10 NH_3 ccm	$k \cdot 10^4$
10	2,37	26,4
20	4,86	28,1
30	7,25	28,9
		Mittel: 27,8

Trockengewicht in 5 ccm = 0,024 12 g.
Aschengehalt = 18,6 Proz.
Uf = 0,069.

Reinigung durch Dialyse.

Obige Lösung wurde gegen 1 Liter Wasser im Eisschrank dialysiert.

6 Stunden 5 ccm Enzymlösung.

Min.	n/10 NH_3 ccm	$k \cdot 10^4$
10	1,80	20,0
20	3,62	20,6
30	5,40	21,0
		Mittel: 20,5

Aktivitätsverlust während der Dialyse = 26 Proz.
Trockengewicht in 5 ccm = 0,011 45 g.
Aschengehalt = 10,2 Proz.
Uf = 0,11.

15 Stunden 5 ccm Enzymlösung.

Min.	n/10 NH_3 ccm	$k \cdot 10^4$
10	0,79	8,5
30	2,47	9,2
40	3,17	8,9
		Mittel: 8,9

Aktivitätsverlust während der Dialyse = 68 Proz.
Trockengewicht in 5 ccm = 0,00270 g.
Aschengehalt = 3,2 Proz.
$Uf = 0,20$.

Zunahme des Reinheitsgrades nach 6stünd. Dialyse : 1,6, nach 15stünd. Dialyse : 2,9.

Adsorptionsversuche mit Aluminiumhydrat.

Das neue Präparat mit $Uf = 0,069$ wurde hinsichtlich der Adsorptionsverhältnisse zu Aluminiumhydrat geprüft.

Zu 50 ccm 0,5proz. Ureaselösung wurden 25 ccm Aluminiumhydratsuspension zugesetzt, hierauf wurde zentrifugiert. Das Adsorbat wurde auf ein Volumen von 50 ccm in Wasser suspendiert. Diese Suspension wurde auf ihre Aktivität geprüft.

5 ccm Suspension.

Min.	n/10 NH_3 ccm	$k \cdot 10^4$
10	2,22	24,8
20	4,41	25,3
30	6,61	26,1
		Mittel: 25,4

Ausbeute bei der Adsorption = 91 Proz.

Die Adsorption geschieht somit mit sehr guter Ausbeute. Dagegen bereitet die Elution Schwierigkeiten; geprüft wurde 1proz. Phosphatlösung von verschiedener Acidität, und zwar ohne nennenswertes Ergebnis. Auch bei Verwendung von Arseniat waren die Ergebnisse bei Variation von p_H nicht besser. Geprüft wurde ferner die Elution mit Sodalösung bei $p_H = 9,5$, ferner mit Essigsäure (0,05 n) bei $p_H = 4,2$ und schließlich mit Phosphorsäure bei $p_H = 2,9$, ohne daß eine erhebliche Elution des Enzyms erreicht wurde.

Um eine Schätzung des Reinheitsgrades des adsorbierten Enzyms vornehmen zu können, wurde die Restlösung und ihr Trockengewicht untersucht.

Trockengewicht in 5 ccm (bei Berücksichtigung der Volumenänderung) = 0,01162 g. Die Ausgangslösung enthielt in 5 ccm 0,02469 g.

Das adsorbierte Trockengewicht beträgt somit 0,01307 g, somit $Uf = 0,117$.

Adsorptionsversuche mit Kaolin.

Wie schon oben erwähnt, ist für die Kaolinadsorption essigsaure Lösung am günstigsten. Mit dem neuen Präparat ($Uf = 0{,}069$) wurden einige verschiedene essigsaure Konzentrationen geprüft. Die Adsorption wurde im übrigen in gleicher Weise durchgeführt wie vorher.

Bei allen folgenden Versuchen wurden 5 ccm Enzymlösung angewandt.

A. 0,015 n Essigsäure.

Min.	Vor der Dialyse		Min.	Nach der Dialyse (15 Stunden)	
	$n/10\ NH_3$ ccm	$k \cdot 10^4$		$n/10\ NH_3$ ccm	$k \cdot 10^4$
10	1,43	15,7	10	0,64	7,0
20	2,85	16,0	20	1,26	6,9
30	4,28	16,4	30	1,91	7,0
		Mittel: 16,0			Mittel: 7,0
	Ausbeute = 58 Proz.			Aktivitätsverlust während der Dialyse = 56 Proz. Trockengewicht in 5 ccm = 0,00228 g. $Uf = 0{,}184$.	

B. 0,03 n Essigsäure.

Min.	Vor der Dialyse		Min.	Nach der Dialyse (15 Stunden)	
	$n/10\ NH_3$ ccm	$k \cdot 10^4$		$n/10\ NH_3$ ccm	$k \cdot 10^4$
10	1,62	18,0	10	0,88	9,7
20	3,15	17,7	20	1,84	10,2
30	4,74	18,3	30	2,58	9,6
		Mittel: 18,0			Mittel: 9,8
	Ausbeute = 65 Proz.			Aktivitätsverlust = 46 Proz. Trockengew. in 5 ccm = 0,00201 g. $Uf = 0{,}282$. Steigerung von Uf 4,1	

C. 0,045 n Essigsäure.

Min.	Vor der Dialyse		Min.	Nach der Dialyse (15 Stunden)	
	$n/10\ NH_3$ ccm	$k \cdot 10^4$		$n/10\ NH_3$ ccm	$k \cdot 10^4$
10	1,37	15,0	10	0,79	8,5
20	2,67	14,9	20	1,61	8,9
30	4,11	15,6	30	2,36	8,8
		Mittel: 15,2			Mittel: 8,7
	Ausbeute = 55 Proz.			Aktivitätsverlust = 43 Proz. Trockengew. in 5 ccm = 0,00230 g. $Uf = 0{,}227$. Steigerung von Uf 3,3.	

Schließlich wurde ein Versuch ausgeführt, um zu ermitteln, ob sich durch eine größere Kaolinmenge des Endergebnis günstiger stellt. Konzentration der Essigsäure: 0,03 n.

Min.	Vor der Dialyse		Min.	Nach der Dialyse (15 Stunden)	
	n/10 NH_3 ccm	$k \cdot 10^4$		n/10 NH_3 ccm	$k \cdot 10^4$
10	1,53	16,8	10	0,52	5,7
20	3,08	17,4	20	1,05	5,7
30	4,60	17,7	30	1,56	5,8
		Mittel: 17,3			Mittel: 5,7
	Ausbeute = 62 Proz.			Aktivitätsverlust = 67 Proz. Trockengew. in 5 ccm = 0,00256 g. Uf = 0,13.	

Der Versuch zeigt, daß die Vergrößerung der Kaolinmenge keine Verbesserung des Ergebnisses herbeigeführt hat.

Es wurde nun Natronlauge und Ammoniak als Elutionsmittel untersucht.

Elution mit NaOH: Die Sorption wurde wie vorher mit 0,03 n Essigsäure durchgeführt. Dabei wurde das Adsorbat in Wasser suspendiert, worauf wir Natronlauge zusetzten, bis die Lösung Phenolphthalein rot färbte.

Min.	Vor der Dialyse		Min.	Nach der Dialyse	
	n/10 NH_3 ccm	$k \cdot 10^4$		n/10 NH_3 ccm	$k \cdot 10^4$
10	1,54	17,1	10	0,87	9,4
20	3,05	17,1	20	1,77	9,8
30	4,53	17,3	30	2,65	9,9
		Mittel: 17,2			Mittel: 9,7
	Ausbeute = 62 Proz.			Aktivitätsverlust = 44 Proz. Trockengew. in 5 ccm = 0,002038 g. Uf = 0,285.	

Uf ist somit auf das 4,1fache erhöht worden. Die Elution mit Natronlauge ergab keine Verbesserung gegenüber derjenigen mit Natriumcarbonat.

Elution mit NH_3: Die Sorption geschah wie vorher in 0,03 n Essigsäure. Die Elution wurde mit 0,02 n NH_3 ausgeführt. Neutralisation mit Essigsäure.

Min.	Vor der Dialyse		Min.	Nach der Dialyse	
	n/10 NH_3 ccm	$k \cdot 10^4$		n/10 NH_3 ccm	$k \cdot 10^4$
10	1,84	20,5	10	0,98	10,8
20	3,64	20,7	20	1,96	10,9
30	5,47	21,2	30	2,91	10,9
		Mittel: 20,8			Mittel: 10,9
	Ausbeute = 75 Proz.			Aktivitätsverlust = 48 Proz. Trockengew. in 5 ccm = 0,00182 g. Uf = 0,36.	

Das so erhaltene Präparat ist also 5,2 mal reiner als das Ausgangsmaterial. Ammoniak scheint als Elutionsmittel etwas vorteilhafter zu sein als Soda oder Natronlauge.

Zweimalige Kaolinadsorption.

Adsorption wie vorher, Elution mit 0,02 n Ammoniak. Das Verfahren wurde zweimal angewandt. In der Lösung, welche nach der zweiten Adsorption erhalten wurde, wurde die Aktivität vor und nach der Dialyse bestimmt.

Min.	Vor der Dialyse		Min.	Nach der Dialyse	
	n/10 NH_3 ccm	$k \cdot 10^4$		n/10 NH_3 ccm	$k \cdot 10^4$
10	1,06	11,7	10	0,40	4,4
20	2,08	11,6	20	0,79	4,3
30	3,16	11,9	30	1,18	4,3
		Mittel: 11,7			Mittel: 4,3
	Ausbeute = 42 Proz.			Aktivitätsverlust = 63 Proz. Trockengew. in 5 ccm = 0,001 727 g. Uf = 0,15.	

Dieses Präparat ist also schlechter als dasjenige, welches durch eine einzige Kaolinadsorption erhalten wurde. Dies beruht darauf, daß die Abnahme des Trockengewichts nicht die großen Aktivitätsverluste kompensierte, die bei der Adsorption und der darauf folgenden Dialyse eintraten.

Die Ausfällung der Eiweißkörper des Serums infolge der Einwirkung von Säuren und Schwermetallsalzen.

Von

Leo Lorber.

(Aus dem Zentrallaboratorium der jüdischen Gemeinde in Budapest.)

(Eingegangen am 31. Dezember 1926.)

Mit 2 Abbildungen im Text.

Die Untersuchungen über den isoelektrischen Zustand geschahen bisher hauptsächlich in sogenannten „reinen" Lösungen; da jedoch die Kolloide unter physiologischen Umständen in nicht reinen Lösungen vorhanden sind, untersuche ich im folgenden den isoelektrischen Zustand der ursprünglichen, nicht dialysierten Serumeiweißkörper bei Anwesenheit verschieden starker (H-Ionen enthaltender) Säuren; ferner, ob ein Zusammenhang zwischen dem Ausfällen der Eiweißkörper durch schwere Metalle (Metallsalze) und dem isoelektrischen Zustand besteht.

Unter isoelektrischem Punkt verstehen wir jenen Zustand der Eiweißkörper und allgemein der Kolloide, in welchem die Anzahl der positiven und negativen Ladungen gleich ist, bei den Eiweißkörpern, wenn $k_a = k_b$ ist. Dieser Zustand der Eiweißkörper, welche ihre elektrische Ladung hauptsächlich den H- und OH-Ionen verdanken, kann durch die Gleichung[1])

$$C_H = \sqrt{\frac{k_a \cdot k_w}{k_b}}$$

charakterisiert werden, worin C_H die dem isoelektrischen Zustande entsprechende Konzentration der H-Ionen, k_a und k_b die sauren bzw. basischen Dissoziationskonstanten und k_w die Dissoziationskonstante des Wassers — $0{,}58 \cdot 10^{-14}$ — bedeuten.

Nach den Ergebnissen der Untersuchungen von *Pauli*[2]), *Sörensen*[3]), *Jacques Loeb*[4]) u. a. ist bei ungleichem k_a und k_b Eiweiß positiver oder

---

[1]) *Pauli*, Kolloidchemie der Eiweißkörper **1**, **34**, **1920**.

[2]) *Derselbe*, l. c.

[3]) *Sörensen*, Ergebn. d. Physiol. **12**, **1912**.

[4]) *Jaques Loeb*, Die Eiweißkörper, **1924**.

negativer Ladung vorhanden. Nach *Sörensen*[1]), *Michaelis*[2]) u. a. können die Eiweißkörper positiver oder negativer Ladung auf den isoelektrischen Punkt gebracht werden, indem die aus der Ungleichheit von k_a und k_b berechneten H- bzw. OH-Ionen der negativ bzw. positiv geladenen Eiweißlösung zugesetzt werden; die H- bzw. OH-Ionen können am einfachsten in Form von Säuren oder Basen in die Lösung eingeführt werden. Das negativ geladene Serum (Eiweiß), bei welchem $k_b < k_a$ ist, kann also auf den isoelektrischen Punkt gebracht werden, wenn eine der Differenz entsprechende Menge H-Ionen der Lösung zugeführt wird. Ich bemerke jedoch, daß aus obiger Ungleichheit auch dann eine Gleichung wird, wenn in der Lösung die OH-Ionen vermindert werden. Mit dem isoelektrischen Zustande gehen noch andere Veränderungen einher; so nimmt die Viskosität minimale Werte an; die Kolloide zeigen keine Elektrophorese, auch entsteht eine starke Dispersionsverminderung, womit die Fähigkeit leichterer Ausfällung einhergeht.

Die Untersuchungen über die Zustandsveränderungen der Kolloide in der Nähe des isoelektrischen Punktes können in einfacher Weise angestellt werden, indem man die Veränderungen der vorhin erwähnten Eigenschaften untersucht.

Bei den in der Folge mitgeteilten Untersuchungen zeigt die Dispersionsverminderung den isoelektrischen Punkt an. Dem Obigen zufolge können wir die Eiweißkörper des Serums auf den isoelektrischen Punkt bringen, indem wir die Ladungsdifferenzen mit H-Ionen ausgleichen. Demgemäß müssen wir also von schwachen Säuren mehr, von starken weniger nehmen, um den isoelektrischen Punkt zu erreichen. Dieses folgt übrigens auch aus den Titrationskurven von *Jacques Loeb*[3]), nach welchen Salzsäure, Oxalsäure und Phosphorsäure im Verhältnis von 1 : 2 : 3 zu einer isoelektrischen Gelatinelösung zuzusetzen wäre, damit diese mit jeder der Säuren die gleiche H-Ionenkonzentration habe. Aus diesen Untersuchungen muß natürlich auch folgen, daß die angesäuerte Gelatine wieder isoelektrisch gemacht werden kann, wenn zu derselben eine mit den H-Ionen äquivalente Menge OH-Ionen zugesetzt wird.

Untersuchen wir, wieviel H-Ionen nötig seien, um die Eiweißkörper des Serums auf den isoelektrischen Punkt zu bringen (d. h. eine Trübung bzw. Fällung darin hervorzubringen), so finden wir, daß beim Vorhandensein von 0,2 ccm Serum ungefähr 1 ccm n/160 HCl, also beiläufig ebensoviel H-Ionen, notwendig ist. Im weiteren Verlauf meiner Untersuchungen mit verschieden starken Säuren war zu bestimmen, wieviel von denselben notwendig ist, um denselben Zustand hervorzubringen; ferner, ob ein Zusammenhang zwischen der Stärke der Säuren und deren Ausfällungsfähigkeit besteht, welcher nach dem Obigen zu finden wäre.

[1]) *Sörensen*, l. c.
[2]) *Michaelis*, diese Zeitschr. 47, 251, 1912.
[3]) *Jacques Loeb*, l. c., S. 47.

Zu diesem Zwecke stellte ich meine Versuche in folgender Weise an (die Ergebnisse derselben sind aus den weiter unten beigefügten Kurven bzw. der Tabelle ersichtlich gemacht).

Die in abnehmenden Konzentrationen äquivalenten Lösungen verschieden starker Säuren wurden in kleinen Reagenzröhrchen gemessen, und zwar je 1 ccm der Säuren. Zu diesen verschieden starken Säuren wurden 0,2 ccm Menschenblutserum gegeben. Nach gründlichem Durchschütteln trat in den einzelnen Röhrchen eine bald stärkere, bald schwächere Trübung ein. Zur genauen Ablesung wurden in die Röhrchen noch je 4 ccm destilliertes Wasser gegeben, worauf dieselben auf 2 Minuten in kochendes Wasser gestellt wurden. Die auf Einwirkung der Säuren entstandenen Trübungen wurden nunmehr sehr intensiv, ohne daß der Charakter der die Wirkung der Säure darstellenden Kurven sich geändert hätte.

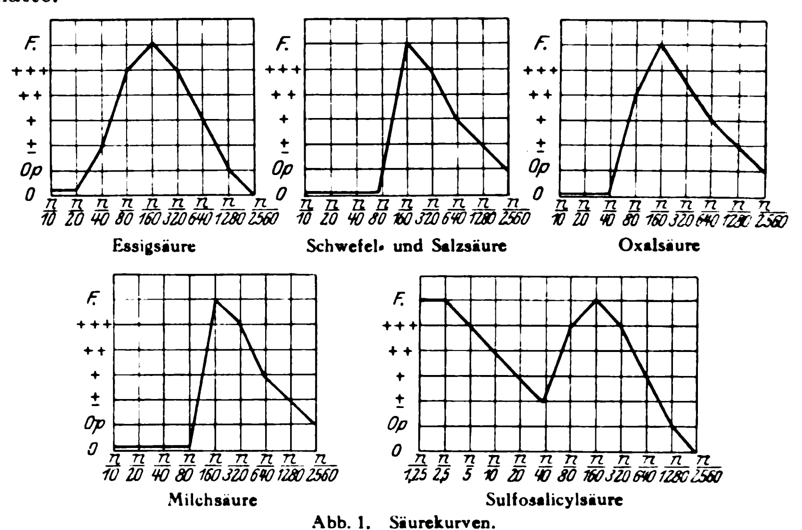


Abb. 1. Säurekurven.

Die Zeichen auf der Ordinate bedeuten: Grad der Dispersionsverminderung [O = maximale, F (= Fällung) = minimale Dispersion]. Die Zeichen auf der Abszisse bedeuten: 1 ccm von der n/10, n/20 usw. starken Säurelösung.

Aus den hier beigefügten Kurven ist ersichtlich, daß das Maximum der Ausfällung, unabhängig von der Stärke der Säuren, bei derselben Konzentration n/160 zu finden ist. Die bei den Kurven angebrachten Bezeichnungen n/10, n/20 usw. bedeuten, daß von den verschiedene Konzentrationen aufweisenden Säuren 1 ccm in dem Reagenzröhrchen vorhanden ist.

Ich möchte mich noch mit der Borsäure und ihrem eigentümlichen Verhalten in dieser Beziehung befassen. Führen wir nämlich obige Versuche mit Borsäure aus, so sehen wir, daß die Fällung der Eiweißkörper weder in n/160, noch in stärkerer Konzentration gelingt. Dieses Verhalten der Borsäure stimmt aber sehr gut mit der oben gegebenen

Definition des isoelektrischen Punktes überein; mit Borsäure, als sehr schwacher und schlecht löslicher Säure, können wir die der Ungleichheit $k_a < k_b$ entsprechende Menge H-Ionen nicht in die Eiweißlösung einführen. Mit meinen, durch oben mitgeteilte Versuche gewonnenen Ergebnissen ist dieses Verhalten der Borsäure jedoch scheinbar nicht übereinstimmend. Aus diesen Versuchen sehen wir nämlich, daß *der isoelektrische Zustand unabhängig vom H-Ionengehalt der verschiedenen Säuren, nur abhängig von ihren äquivalenten Mengen hervorgerufen werden kann.* Das Verhalten der Borsäure wird aber verständlich, wenn man bedenkt, daß auch, bei Ausschluß von Eiweiß, Alkalien mit Borsäure nicht zu neutralisieren sind[1]), d. h. wenn man zu n/160 NaOH in äquivalenter Menge oder deren Mehrfachem entsprechende H_3BO_3 hinzufügt, bleibt die Lösung auch weiterhin alkalisch. Wenn aber die Lösung alkalisch reagiert, dann kann das Eiweiß nicht ausgefällt werden; und wenn die Borsäure das reine NaOH zu neutralisieren vermöchte, dann könnte auch das Eiweiß — unabhängig vom Gehalt an reinem H-Ion — durch dieselbe auf den isoelektrischen Punkt gebracht werden

Nach den Untersuchungen von *Thomson*[2]) wird jedoch die Borsäure titrierbar, d. h. sie vermag Laugen zu neutralisieren, wenn zu ihrer Lösung höhere Alkohole, z. B. Glycerin, Mannit usw., zugesetzt werden.

Wenn wir in den Versuchen statt der destilliert wässerigen eine glycerin-wässerige Lösung der Borsäure anwenden, so können die Eiweißkörper auch durch die sehr wenig H-Ionen enthaltende Borsäurelösung, übereinstimmend mit der obigen Annahme, auf den isoelektrischen Punkt gebracht werden. Die Ergebnisse dieses, den oben mitgeteilten analog durchgeführten Versuches sind in folgender Tabelle zusammengefaßt:

	n/20	n/40	n/80	n/160	n/320
Borsäure			Keine Fällung		
Borsäure + Glycerin . . .	+++	++(+)	++	±	—
Glycerin + Aqua			Keine Fällung		

Wie aus dieser Tabelle ersichtlich, ist die neutrale, glycerinwässerige Lösung ohne Wirkung auf das Eiweiß.

Ferner wird nach den Untersuchungen *Thomsons* das H_3BO_3 in Glycerinlösung nicht unter äquivalenten Verhältnissen gebunden; denn 1 Molekül Borsäure neutralisiert nur 1 Molekül NaOH; aus der Tabelle sehen wir, daß auch die Ausfällung des Eiweißes auf dieselbe Weise erfolgt.

[1]) *C. L. Winkler*, Zeitschr. f. angew. Chem. **27**, 630, 1917; **28**, 48, 1915.
[2]) *Thomson*, Zeitschr. f. angew. Chem. 1897, S. 5.

Aus den bisherigen Untersuchungen im allgemeinen und dem Verhalten der Borsäure im besonderen sehen wir, daß *das Blutserum dadurch auf den isoelektrischen Punkt zu bringen ist, daß man das im Blutserum vorhandene Alkali nach den Gesetzen der Stöchiometrie bindet, unabhängig von der H-Ionenkonzentration der Säurelösungen.*

Wenn obige Auffassung richtig ist, dann sind die Eiweißkörper auch durch andere Alkali bindende Chemikalien auf den isoelektrischen Punkt zu bringen, selbst durch solche, welche keine H-Ionen enthalten. Diese Eigenschaft besitzen bekanntlich die Schwermetalle.

Die Schwermetalle bilden nämlich mit dem Alkali in Wasser unlösliche Metalloxyde bzw. Metallcarbonate, z. B. $CuSO_4 + 2\,NaOH = Cu(OH)_2 + Na_2SO_4$.

Wenn also die Lösung irgend eines Schwermetalls zum Serum hinzugefügt wird, so muß, dem Obigen zufolge, durch Alkaleszenzverminderung der isoelektrische Punkt zustande kommen, das Eiweiß muß ausgefällt werden. Aus den oben mitgeteilten Kurven ist zu sehen, daß die Ausfällung des Eiweißes in äquivalenten Mengen mit den die Fällung bewirkenden Säuren erfolgt.

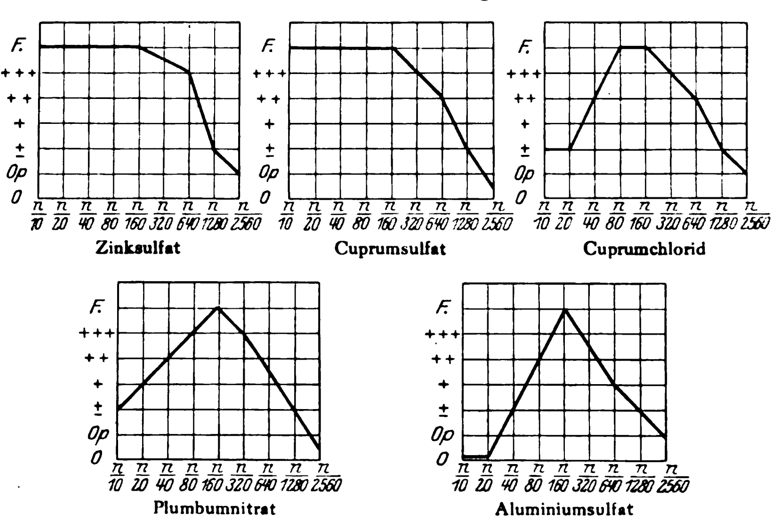


Abb. 2. Schwermetallsalzkurven.
Die Zeichen auf der Ordinate bedeuten: Grad der Dispersionsverminderung [O = maximale, F (= Fällung) = minimale Dispersion]. Die Zeichen auf der Abszisse bedeuten: 1 ccm von der n/10, n/20 usw. starken Schwermetallsalzlösung.

Vergleicht man die Kurven, welche die Fällung durch Säuren und durch Metalle darstellen, so sieht man, daß, wie auch aus dem oben Dargelegten folgt, *die Fällung der Eiweißkörper durch Säuren und durch Metalle quantitativ nach denselben Gesetzen erfolgt*; d. h. die *Ausfällung der Eiweißkörper geschieht bei derselben Konzentration der Säuren*

und Metalle, weil beide auch die Alkalien in äquivalenter Menge neutralisieren.

Qualitativ zeigen die Kurven eine gewisse Individualität. Beim Vergleich derselben sehen wir, daß die Fällung durch Säuren bzw. das Maximum der Ausfällung um n/160 beginnt. Erhöht man die Konzentration der Säuren, so lösen sie die Eiweißkörper in geringerer oder größerer Konzentration wieder auf. Die Grenzkonzentration dieses Lösens ist, wie ebenfalls ersichtlich, der Stärke der Säuren proportional. Daher kommt es, daß die Ausfällungskurve bei starken Säuren steil ist, während sie bei schwachen Säuren einen verzogenen Verlauf zeigt und bei ganz schwachen Säuren, wie Borsäure, Kohlensäure, der das Lösen anzeigende Teil der Kurve gar nicht zu finden ist.

Steigert man die Konzentration der Säure über den isoelektrischen Punkt hinaus, dann entstehen — wie wir aus älteren Untersuchungen wissen — saure Eiweißkörper, die sich dann, abhängig von der Stärke der untersuchten Säure, bei geringerer oder stärkerer Konzentration lösen.

Besonders erwähnt zu werden verdient, wegen ihres interessanten Verlaufs, die Kurve der Sulfosalicylsäure; dieselbe zeigt zwei Spitzen, deren erste mit der Spitze der Kurven anderer Säuren zusammenfällt und die spezifische Fällung anzeigt; die zweite zeigt das spezifische Eiweißfällungsvermögen der Säure an.

Vergleicht man die Kurven der Schwermetalle, so findet man eine ähnliche Individualität wie bei den Säuren. Ein Teil verhält sich wie bei sehr schwachen Säuren, wie $ZnSO_4$, $CuSO_4$, andere hingegen wie bei starken Säuren, $Al_2(SO_4)_3$, $PbNO_3$; d. h. während die ersteren das Eiweiß bei der über n/160 untersuchten Konzentration nicht lösen, lösen letztere, bei Steigerung der Konzentration der Salze über n/160, das Eiweiß wieder auf. Dieses Verhalten der Schwermetalle kann dem Obigen zufolge, folgendermaßen erklärt werden: wenn wir in einer Eiweißlösung die Konzentration des $CuSO_4$ oder des $ZnSO_4$ noch so erhöhen, können wir, da deren Lösungen neutral sind, die zum Wiederauflösen der Eiweißkörper erforderliche H-Ionenkonzentration nicht erreichen, und die Eiweißkörper bleiben auch weiter auf dem isoelektrischen Punkt[1]). Die Al- und Pb-Salze, welche eine den starken Säuren identische Kurve aufweisen, werden in Wasser hydrolytisch gespalten, so ist z. B. in der wässerigen Lösung des $Al_2(SO_4)_3$, $Al(OH)_3$ und H_2SO_4 anwesend; das gleiche gilt auch von $PbNO_3$, dessen Lösungen ebenfalls hydrolytisch gespalten werden. In solchen Metallsalzlösungen sind also in Wirklichkeit *Säuren* anwesend, und das im Serum vorhandene

[1]) Ich bemerke, daß bei Anwendung einer sehr starken Metallsalzlösung auch die Eiweißkörper sich lösen (*Zsigmondy*, Kolloidchemie, 1922, S. 351).



Alkali wird nicht infolge Einwirkung des schweren Metalles, sondern auf Einwirkung der anwesenden Säure neutralisiert, und daher zeigen sie die für die starken Säuren charakteristische Kurve.

Ich bemerke, daß ich die Pufferwirkung des Serums bei der Erklärung der oben mitgeteilten Erscheinungen geflissentlich unberücksichtigt ließ, denn, wie wir sehen, können diese Erscheinungen sehr wohl auch ohne jene gedeutet werden.

Zusammenfassung.

1. Die verschieden starken Säuren bringen die Eiweißkörper des Blutserums in äquivalenter Menge auf den „isoelektrisch" genannten Zustand, unabhängig von der H-Ionenkonzentration der Säurelösungen.

2. Die Eiweißfällung verschiedener Schwermetalle erfolgt gleichfalls in äquivalenter Konzentration, welche mit der Ausfällungskonzentration der Säuren identisch ist; diese Konzentration ist im Falle von 0,2 ccm Serum etwa n/160.

3. Die Ausfällung der Serumeiweißkörper, d. h. das Bringen derselben auf den isoelektrischen Punkt, geschieht durch Bindung des titrierbaren Alkalis, unabhängig von der H-Ionenkonzentration der Lösungen.

Über die Beziehungen von Blutzuckerhöhe, spezifisch-dynamischer Wirkung und Verbrennung bei einer Anzahl von Kohlehydraten.

Von

Kurt Schirlitz.

(Aus dem pharmakologischen Institut der Hamburgischen Universität.)

(Eingegangen am 5. Januar 1927.)

Mit 4 Abbildungen im Text.

Die Versuche, über die in dieser Arbeit berichtet werden soll, bilden die Fortsetzung einer Versuchsreihe, die *Bornstein* und *Holm* (4), sowie *Holm* (5) früher im gleichen Institut angestellt haben. Aus diesen Versuchen ging hervor, daß wenige Minuten nach peroraler Zufuhr von 100 g Traubenzucker beim nüchternen Menschen der Blutzucker ansteigt. Respirationsversuche zeigten, daß die Verbrennung des im Blute kreisenden Zuckers zu dieser Zeit noch nicht beginnt. Sie setzt erst ½ bis 1½ Stunden später ein, nachdem der Blutzucker schon recht hohe Werte angenommen, häufig nachdem er schon den Höchstwert erreicht oder überschritten hat. Die weitere Verbrennung des zugeführten Zuckers kann bei niedrigen Blutzuckerwerten erfolgen; ein Parallelismus zwischen Höhe des Blutzuckers und Umfang der Zuckerverbrennung nach Traubenzuckerzufuhr besteht also nicht.

Des weiteren zeigten diese Versuche, daß nach Lävulose der Anstieg des Blutzuckers gering ist, daß aber dieses Kohlehydrat sofort verbrennt. Milchzucker bewirkt eine geringe oder gar keine Steigerung des Blutzuckers, erst nach 1 Stunde eine mäßig vermehrte K.-H.-Verbrennung, die entfernt nicht so stark ist, wie bei Lävulose und Dextrose.

Zum Vergleich führen wir noch die Arbeit von *Benedict* und *Carpenter* (3) an.

Auch sie beobachteten die schnell einsetzende Verbrennung der Lävulose. Ein ähnliches Bild geben auch die Versuche mit Rohrzucker. Zu beiden im Gegensatz steht die Dextrose, die erst später und langsamer verbrannt wird.

Die Versuche von *Bornstein* und *Holm* sind mit der *Zuntz-Geppert*schen Methode, diejenigen von *Benedict* und *Carpenter* mit dem *Benedict*schen „Universalapparat“ angestellt. Beide geben sachlich die gleichen Werte. Sie zeigen in ihrer Übereinstimmung, daß bei sorgfältigem Arbeiten mit gut eingearbeiteten Versuchspersonen man sehr wohl respiratorische Quotienten erhält, die Schlüsse über die Art der Verbrennungen gestatten.

In den Versuchen von *Bornstein* und *Holm* waren nur die Beziehungen zwischen Höhe des Blutzuckers und der Verbrennung des zugeführten K.-H. besprochen worden. Dagegen war die Erhöhung des Energieumsatzes, die durch die K.-H.-Zufuhr bedingt war, nicht in den Bereich der Betrachtung gezogen worden. Wir wollen diese Oxydationssteigerungen, dem jetzt herrschenden Brauche entsprechend, als spezifisch-dynamische Wirkung (sp. d. W.) bezeichnen, ohne zunächst über ihr Wesen etwas auszusagen. Die sp. d. W. nach K.-H.-Zufuhr bildet den Hauptgegenstand dieser Arbeit, in der wir eine Reihe von K.-H. untersucht haben, und zwar nach:

A. der absoluten Größe der sp. d. W.,
B. etwaigen Beziehungen zur Verbrennung der K.-H.,
C. ,, ,, ,, Höhe des Blutzuckers.

Methodik.

Die Versuche wurden am *Zuntz-Geppert*schen Apparat etwa 13 Stunden nach der letzten Mahlzeit ausgeführt. Sie wurden nur an gut eingeübten Versuchspersonen vorgenommen, die in wenigen Fällen wenigstens 1½, meist 7 bis 8 Stunden vorher auf dem Sofa lagen, auf dem die Versuche durchgeführt wurden. Am Tage vorher war eine im wesentlichen aus Eiweiß und Fett bestehende Nahrung genossen worden. Ein Teil der Versuche geschah an zwei Hunden. Beide Tiere, ein Pinscher und eine Wolfshündin, waren nach ihrer Tracheotomie sorgfältig und liebevoll behandelt, hatten keine Scheu mehr und gehorchten gut. Das Temperament war ruhig. Die Tiere wurden in je vier bis sechs Vorversuchen an verschiedenen Tagen gut „eingeatmet“, d. h. sie mußten sich soweit an den Versuchsraum mit den Apparaten gewöhnen, daß die notwendigen Handgriffe weder ihre Beachtung mehr noch etwa Angst vor etwas unbestimmt Drohendem erregten. Am Morgen wurde dann mit der Nüchterndoppelbestimmung begonnen. Wenn es in Betracht kam, erfolgte auch die Nüchternblutzuckerprobe, und zwar sofort im Anschluß an ein abgeschlossenes Rohr. Die Blutentnahmen waren beim Menschen und Hunde gleichermaßen am Ohr (beim Tiere rasiert) durch einen mäßigen Ritz am Versuchsanfang. Ein einfaches starkes Überwischen genügte für die nächsten Entnahmen zur Neublutung. Die Hunde blieben ganz ruhig dabei. Die Blutverarbeitung geschah nach dem Analysenverfahren nach *Hagedorn*. Danach erfolgte die Zuckergabe in den in den Tabellen stehenden Mengen. Es wurde im Liegen aus einem Rohre gesogen. Die Hunde erhielten bei guter Hilfsstellung den Zucker durch den Magenschlauch. Eine wesentliche Erregung ist nie eingetreten, die nötige Beruhigung trat während einiger Minuten des Maulschleckens sehr schnell ein. Es wurde darauf die Tamponkanüle eingelegt (nicht vorher, sonst gibt es Druckschmerzen und das Tier wird unruhig) und das Tier in die feuchte Gasuhrleitung eingeschaltet. 10 Minuten

bis ¼ Stunde nach der Zuckergabe konnte meist der erste Teilversuch beginnen. In der ersten Stunde erfolgten meist drei Bestimmungen, dann in größerem, später in stündlichem Abstand (s. Tabellen).

Beschwerden, bis auf einmal etwas Durchfall, sind nicht aufgetreten. Auch das Schlucken des schlecht schmeckenden Maltose- und des Stärkekleisters ging ganz leidlich. Die zweite Stärke-„Mahlzeit" war durch vier Tabletten Saccharin schmackhafter gemacht.

Die Gasanalysen lagen in der Hand der alteingearbeiteten Laborantin, Fräulein *M. Nickau*.

Zur *Berechnung* ist allgemein folgendes zu sagen:

Da es sich nur um Zeitausschnitte handelte, mußte die Zwischenzeit aus dem Mittelwert des vorhergehenden und des folgenden Teilversuchs errechnet werden. Die Prozentzahl der sp. d. W. jedes K.-H. ergibt sich also aus der Summe der beobachteten Teilversuche plus der Summe der errechneten Werte der Zwischenzeiten. Als Nüchternwert ist ferner bei den Hunden und den Selbstversuchen eine Zahl angenommen, die sich als Mittel ergibt aus den vorliegenden zusammen mit einer ganzen Reihe anderer Atmungsversuche der betreffenden Lebewesen. Wir glauben damit besser der Tatsache Rechnung zu tragen, daß durchaus nicht immer die Werte wieder erreicht werden, die an dem einen betreffenden Morgen nun gerade als Nüchternwerte gefunden sind. Die Stoffwechsellage pendelt um eine gewisse Mittellage. Sie kehrt daher öfters, wenn sie z. B. zufällig anfänglich hoch lag, nicht dorthin zurück, sondern stellt sich auf einen tieferen Punkt ein. Auch das Umgekehrte kann der Fall sein. Diese Art des Ausgangspunktes konnte aus äußeren Gründen für die Berechnungen für Versuche, die wir aus dem Schrifttum entnahmen, nicht eingehalten werden.

Aus O_2 und dem R.-Q. ergibt sich nach der bekannten *Zuntz*schen Rechnung der Wert der verbrauchten Kalorien. Von diesem Kalorienwert wurde der „Nüchternwert" (s. oben) abgezogen und je nach der Versuchsdauer multipliziert mit seiner Zeitzahl. Dieser Wert ist als „Kaloriendifferenz" für den betreffenden *ganzen* Teilversuch in der nächsten Säule zu finden. Diese Säule ist also die einzige, die keine Minutenwerte anzeigt. Sinngemäß errechnet sich der Wert für die Zwischenzeit. Die Summe dieser Spalte ist daher die kalorische Verbrauchssumme, die auf Hundert in Verbindung gesetzt wurde mit 410 Kalorien einheitlich für alle 100 g K.-H.

Absolute Größe der spezifisch-dynamischen Wirkung.

Zur Verfügung stehen Versuche mit sechs verschiedenen K.-H., nämlich Stärke, Lävulose, Rohrzucker, Maltose, Traubenzucker und Milchzucker. Die Nennung erfolgte in der Reihenfolge ihrer stärksten bis zur schwächsten sp. d. W., von 9,25 bis 1,15 Proz. durchschnittlich. Wir haben aus dem Schrifttum (4) (5) (6) eine weitere Anzahl von Versuchen in der gleichen Art wie unsere eigenen durchgerechnet und mit in der Tabelle II aufgeführt. Hinsichtlich des Traubenzuckers ist zwischen den eigenen und den Versuchen aus dem Schrifttum eine sehr gute Übereinstimmung festzustellen, während die Lävuloseversuche eine kleinere Spannung zeigen von 9 zu rund 4,4, die aber im Grunde genommen immer noch in der gleichen Größenordnung bleiben.

Die sehr zahlreichen Versuche *Benedicts*[1]) liegen mit 6 Proz. etwa in der Mitte. Soweit Tierversuche, die nur für Maltose und Lävulose vorliegen, in Betracht kommen, liegen deren Zahlen innerhalb der bei Menschen gefundenen Werte. Auch beim Tiere zeigt die Lävulose eine etwas stärkere sp. d. W. als die Maltose. Im ganzen können die Zahlenwerte aller Versuche für gleichsinnig gehalten werden.

Tabelle I.

	Eigene Versuche		Nach Schrifttumsangaben			Durchschnitt Eigen	Durchschnitt Schrifttum	Durchschnitt Gesamt
			Mensch.					
An Stärke	10,3	8,2				9.25		9.25
Lävulose	10,2	9,2	4,2	3,7		9,1	3,95	6.53
Rohrzucker	4,4	8,0				6,2		
Maltose	5,5							
Traubenzucker	5,2	2,8	3,7	3,0	6,8	4,0	4,5	4.25
Milchzucker			1,8	0,5			1,15	
			Tier.					
Lävulose	7,8					7,8		
Maltose	4,2	7.9						
	6,5					6,54		
	8,8	5.3						

Beziehung zwischen spezifisch-dynamischer Wirkung und Verbrennung der Kohlehydrate.

Diese Frage läuft auf einen Vergleich der Zahlen des Sauerstoffs und der respiratorischen Quotienten hinaus.

Bei der Stärke zeigt sich im ersten Versuch nach der Stärkegabe sofort ein Anstieg der O_2-Menge von 10 Proz.[2]), während aus dem praktisch unverändert gebliebenen R.-Q. auf noch keinerlei im Körper vor sich gehende Verbrennung geschlossen werden muß. Erst nach rund $^3/_4$ bis 1 Stunde setzt diese ziemlich stark ein, bei einem weiteren O_2-Anstieg um 20 Proz. Vermehrung. Von hier ab sinkt der O_2-Bedarf in den nächsten $1^3/_4$ Stunden auf Werte von + 10 Proz., während der R.-Q. als Ausdruck zunehmender Verbrennung noch etwas ansteigt. Im zweiten Versuch beginnt der O_2-Anstieg erst etwas später, doch dann erheblich, um annähernd 15 Proz., während erst vom dritten Teilversuch nach Zuführung der Stärke eine Verbrennung festzustellen ist. Diese hält sich wesentlich länger auf ziemlicher Höhe, während die O_2-Werte nur noch eine Erhöhung von rund + 5 Proz. ergeben.

[1]) S. 235.

[2]) Die Art „Prozent"-Angaben berücksichtigen nur ganz grob 5, 10, 15 und 20 Proz.

Ergebnis: Schon frühzeitig nach Zufuhr der Stärke Erhöhung des O_2-Bedarfs um 10 bis 20 Proz. bei erst später einsetzender Verbrennung, die in der Stärke (Intensität) und zum Teil auch in der Zeit die sp. d. W. überdauert.

Lävulose 2 zeigt den Unterschied zwischen dem abgeklungenen O_2-Bedarf und der auf vollster Höhe sich befindenden Verbrennung am besten im vierten Teilversuch. Im Versuch 3 ist von einer Verbrennung noch nicht die Rede, im ersten Teilversuch nach der Zuführung, obgleich die sp. d. W. schon nahe an ihren Höhepunkt herangerückt ist. Lävulose 1 ist dadurch beachtenswert, daß gerade umgekehrt die Verbrennung viel eher auf der Höhe ist, während sich die sp. d. W. noch in wesentlich tieferen Grenzen bewegt. Erst nach 1½stündiger Senkung von R.-Q. ist der O_2-Bedarf am höchsten. Gerade diese Verschiedenheit zeigt am besten, daß sicher kein zwangsläufiges Nebeneinanderlaufen der beiden zu vergleichenden Vorgänge anzunehmen ist.

Die berechneten Lävuloseversuche aus dem Schrifttum zeigen ein Bild, wie es von meinem Lävuloseversuch 1 soeben beschrieben ist. Früher einsetzende Verbrennung bei allen beiden. In H. ist schon nach 30 Minuten der Höchstwert erreicht, während in G., rein zahlenmäßig betrachtet, der Höchstwert zwar nach 2 Stunden liegt (1,04); doch ist tatsächlich kein Unterschied festzustellen mit dem gleichgroßen Werte von 1,01 nach 45 Minuten. Hier setzt nun deutlich verspätet die sp. d. W. ein, indem diese mit + 10 Proz. erst nach ¾ Stunden beginnt.

Im Gesamtbild stehen damit drei Lävuloseversuche mit keinem bzw. nur kleinem sofortigen O_2-Anstieg, zwei (Nr. 2 und 3) mit sofort stark einsetzender sp. d. W. gegenüber. Ferner zeigen drei (Nr. 2, Nr. 1 schlechter, G. sehr gut), wenn auch nicht gleichmäßig gut, daß die Verbrennung unabhängig vom O_2-Verbrauch weiter geht, während die zwei anderen ein annähernd gleichmäßiges Abklingen von O_2- und R.-Q.-Werten erkennen lassen.

Rohrzucker. Zwei anfänglich gleichlautende eigene Versuche. Sofortige sp. d. W. bei erst im zweiten Teilversuch nach der Stärkegabe sich zeigender Verbrennung des Zuckers. Diese ist nach 30 Minuten voll ausgebildet. Aber einmal hört die sp. d. W., beim zweiten Male die Verbrennung zuerst auf.

Maltose (zur Hauptsache Tiermaterial).

Versuch 1. Ein einigermaßen gleichlaufendes Wirken von O_2-Aufnahme- und Verbrennungsvorgängen; eine mäßige sp. d. W., die deutlicher nur im Beginn, vierten und sechsten Teilversuch wird. Dabei aber durchaus kräftige K.-H.-Verbrennung (R.-Q. von 7,4 auf 0,89) von Anfang bis Ende der untersuchten Zeit.

Versuch 2. Die sp. d. W. geht im zweiten Teilversuch auf den Ausgangswert zurück, während die Verbrennung unverändert weiter geht.

Versuch 3. Ähnlich 1. Sp. d. W. und R.-Q. gleichlaufend.

Versuch 4. Auffallend ein starkes anfängliches Herabgehen des O_2-Verbrauchs unter den Nüchternwert bei gleich gut hervortretender Verbrennung. Der Höhepunkt der sp. d. W. liegt vor dem Höchstwert des R.-Q. Schneller Abfall der sp. d. W. bei weitergehender Verbrennung.

Versuch 5. Starke sp. d. W., zunächst ohne Änderung des R.-Q. Zusammenfallen beider Höchstwerte. Wesentlich vorzeitiges Aufhören der sp. d. W. bei noch stark und lange bestehender Zuckerverbrennung.

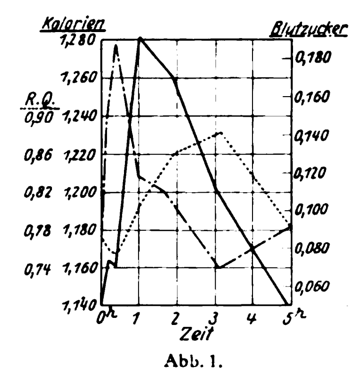


Abb. 1.

Versuch 6 (Mensch, s. Abb. 1). Hier setzten beide untersuchten Erscheinungen gleichmäßig verspätet ein; doch dann deutlich das häufigere Bild: stärkere und kürzere Welle der sp. d. W., später ansteigende und länger dauernde Zuckerverbrennung. Gerade hier ein besonders klares Beispiel für das nicht Hand-in-Hand-Gehen dieser beiden Vorgänge; der Höchstwert des R.-Q. zu einer Zeit, wo die sp. d. W. schon wesentlich abgefallen ist.

Gesamtbild: Vier Versuche (Nr. 2, 4, 5, 6), die eine deutliche Selbständigkeit der sp. d. W. im Vergleich zum R.-Q. zeigen gegenüber zweien, bei denen eine Unabhängigkeit beider Funktionen nicht abzulesen ist.

Traubenzucker.

Die zwei eigenen und die drei Versuche C, D und F ergeben ein fast übereinstimmendes Bild bis auf einen (D), wo der O_2-Anstieg zuerst nur gering ist. Im übrigen ist überall zunächst ein Ansteigen des O_2-Verbrauchs zu bemerken; erst später, wenn der O_2-Verbrauch schon sehr hoch ist, beginnt mit einem Steigen des R.-Q. eine Verbrennung des Zuckers. In allen fünf eine ganz beträchtlich kürzere Dauer der sp. d. W. Ferner: zweimal (C und D) liegen die Verbrennungshöchstwerte des Zuckers bei einem Ruhesauerstoffbedarf, zweimal fallen O_2- und R.-Q.-Höchstwerte wesentlich auseinander (F und Sch) und nur einmal (Kr) liegen beide in dem gleichen Teilversuch.

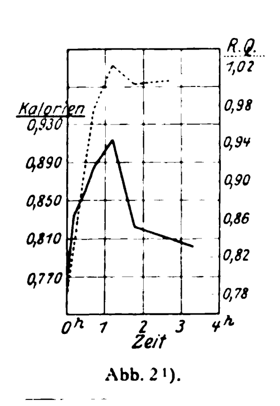


Abb. 2[1]).

[1]) Material stammt von einer Patientin, die nicht so lange für den Versuch zur Verfügung stand. Es kommt der „Abstand" zwischen der fast normalen sp. d. W. und der noch starken Verbrennung im fünften und sechsten Kurvenpunkt gut zum Ausdruck.

Milchzucker.

Praktisch genommen ist diese sp. d. W. fast gleich Null. Ebenso fällt bei der Verfolgung der R.-Q.-Werte das noch spätere Auftreten und ihre verhältnismäßige Schwäche auf.

Bei der Betrachtung aller K.-H.-Versuche insgesamt hinsichtlich der Frage, ob eine Gleichheit oder Ungleichheit in dem Verhalten der sp. d. W. zu den Verbrennungsvorgängen vorliegt, wollen wir uns die Versuchsergebnisse noch mehr vereinfachen. Dazu gliedern wir die Versuche in drei weitere, kleine Tabellen, in denen ausgesagt wird:

1. über den Anfang der sp. d. W., ob vor, mit oder nach Einsetzen der Verbrennung,
2. über den Höhepunkt der sp. d. W.,
3. über das Ende der sp. d. W., immer im Vergleich zum R.-Q.

Tabelle II.

	Spezifisch-dynamische Wirkung								
	vor	mit	nach	vor	mit	nach	vor	mit	nach
	dem Beginn			dem Höhepunkt			dem Ende		
	der Kohlehydratverbrennung								
Stärke	1 2			1	2		2	1	
Lävulose . . .		1 2 3	H G	2 3 G		1 H	1 2 G	H	3
Rohrzucker . .		1 2		2	1		1 2		
Maltose . . .	5 6	1 2 3	4	2 4 6	1 3 5		3 4 5 6	1 2	
Traubenzucker	1 C D F	2		1 C D F	2		1 2 C D F		
Milchzucker *)	1			1			1		
Gesamtzahl . .	9 mal	9 mal	3 mal	13 mal	6 mal	2 mal	16 mal	4 mal	1 mal

*) Nur Versuch 1 gewertet.

Anmerkung. Die Zahlen bzw. Buchstaben beziehen sich auf die ebenso genannten Versuche.

Höhepunkt und Ende zeigen mit starkem Überwiegen, daß im Durchschnitt die sp. d. W. nicht zusammenfällt mit der im Körper einsetzenden Kohlehydratverbrennung. Die Tabelle „Anfang“ gibt ein gemischtes Bild. Namentlich beim Traubenzucker setzt die sp. d. W. fast immer früher ein als der Anstieg des R.-Q. In weitaus der Mehrzahl der Versuche ist die sp. d. W. schon abgeklungen, wenn die Verbrennung der K.-H. noch auf der Höhe ist. *Wir müssen daraus schließen, daß die sp. d. W. nichts mit der Verbrennung der zugeführten K.-H. zu tun hat.* Häufig ist die sp. d. W. schon auf der Höhe, wenn eine Verbrennung noch nicht oder kaum begonnen hat. Die sp. d. W. ist also durchaus in die assimilatorische Phase des K.-H.-Stoffwechsels zu verlegen, darf aber doch nicht mit der Aufsaugungsarbeit aus dem Darm in die Chylus- und Blutgefäße gleichgehalten werden (s. den letzten Abschnitt dieser Arbeit).

Beziehung des Blutzuckers zur Verbrennung der Kohlehydrate.

Blutzuckerentnahmen nach der Mikromethode nach *Bang* und dem *Hagedorn*schen Analysenverfahren sind bei den einfachen Zuckern gemacht worden. Von den Di- und Polysacchariden des Rohrzuckers und der Stärke, die eine technisch andere, weit langwierigere Behandlung zur quantitativen Erfassung beansprucht hätten, mußte abgesehen werden.

Es liegen vor:

6 Angaben über Maltose (5 vom Hund, 1 vom Menschen),
3 ,, ,, Lävulose,
5 ,, (davon 1 intravenös) über Traubenzucker,
2 ,, über Milchzucker.

In den früheren Arbeiten des Instituts ist die Ansicht ausgesprochen, daß ein Parallelismus zwischen der Höhe des Blutzuckers und der Größe der K.-H.-Verbrennung nicht besteht. Die Ansicht ist namentlich im Falle der Verbrennung des Traubenzuckers mit Beispielen belegt (siehe Versuche vom 29. August 21. und 20. Oktober 1921).

Auch in neueren Versuchen findet sich das gleiche. In beiden Versuchen mit Traubenzucker ist die K.-H.-Verbrennung auf der Höhe zu einer Zeit, in der der Blutzucker schon wieder normale (Nr. 1) oder wesentlich tiefere (Nr. 2) Werte angenommen hat. Andererseits ist im ersten Traubenzuckerversuch der Blutzucker auf seinem höchsten Wert angelangt, während der R.-Q. noch nicht angestiegen ist (Abb. 3).

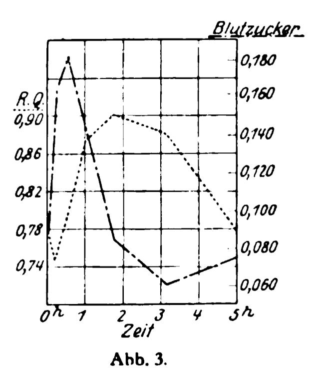


Abb. 3.

Hier sei ein besonderer Versuch erwähnt, der aus einer anderen, noch nicht veröffentlichten Untersuchungsreihe Prof. *Bornsteins* stammt. Hier ist die Dextrose intravenös gegeben. Wir sehen, daß allein die Höhe des Blutzuckers sicher nicht gleichbedeutend ist mit Verbrennungsvorgängen, denn unverändert steht ein R.-Q. von 0,833 einem von 0,091 auf 0,191 mg (vorher schon 0,219) gestiegenen Blutzucker gegenüber.

Ähnlich liegen die Verhältnisse bei den Lävuloseversuchen in den späteren Stunden (s. besonders Nr. 3). Auch bei unseren Versuchen mit Maltose findet man häufig Entsprechendes. Am klarsten ist der Selbstversuch 6, Neben-Nr. 3.

Versuch 3. In diesem macht die Verbrennung den raschen Anstieg des Zuckerwertes nicht mit. Selbst beim Zuckerhöchstwert von 0,239 ist eine Verbrennung noch nicht ausgelöst. R.-Q. bei 0,85, während sein Anfangswert 0,83 war.

Versuch 6. Der Beginn ähnlich wie Versuch 3. Bei allen hohen Blutzuckerwerten kann von keiner, oder zumindest keiner beträchtlichen Verbrennung die Rede sein. Erst bei normaler Zuckerhöhe liegt der R.-Q. höher und steigt bei dem tiefen Zuckergehalt von 0,069 noch zu seinem Spitzenwert von 0,88.

Gerade Beobachtungen wie diese letzten beiden zeigen, daß kein notwendiger Parallelismus zwischen Blutzuckerhöhe und Verbrennungsvorgängen bestehen muß. So einfach, daß das vorhandene Brennmaterial im Blute notwendig sofort Verbrennungsvorgänge bedeutet, liegen die Verhältnisse also nicht.

Die Spannung, die in den Traubenzuckerversuchen zwischen den meisten R.-Q.-Punkten und den Blutzuckerwerten abgelesen werden kann, ist zu offensichtlich. Es betonen sich jetzt damit die Fälle, in denen von einem direkten Parallelismus zwischen R.-Q. und Blutzuckergehalt nicht die Rede sein darf, mag auch eine Anzahl Versuche einen gewissen Zusammenhang scheinbar erkennen lassen. Die Versuche, in denen ein Parallelismus nicht besteht, sind die für die Beantwortung der Frage grundsätzlich wichtigeren. Es müssen also für die direkte Einleitung der Verbrennung noch andere Bedingungen gefordert werden.

Wegen der geringen Ausschläge beim Milchzucker ist von einer Wertung abgesehen worden.

Verhältnis von spezifisch-dynamischer Wirkung und Blutzucker.

Es werden dieselben soeben besprochenen Angaben für Maltose, Lävulose und Traubenzucker gesichtet.

Maltose 1. Anfänglich ein Hinaufschnellen beider Werte. Während der Zucker aber weiter steigt, sinkt die sp. d. W. wieder, um dann abermals höhere Werte zu bekommen, während der B.-Z. fast wieder zur Norm zurückgekehrt ist. Wertung: Sp. d. W. ist unabhängig vom B.-Z.

Maltose 2. Ein ziemlich ähnliches Bild. Gemeinsamer starker Anstieg. Dann aber zum Teil starke Spannung zwischen der wieder erstmalig abgeklungenen sp. d. W. und dem hohen B.-Z. Der Abfall setzt gemeinsam ein, zeigt am Ende aber doch noch einmal eine betontere Ungleichheit. Wertung: Unabhängig.

Maltose 3. Bei dem Höchstwert des B.-Z. von 0,239 eine noch minimale sp. d. W. Erst 1 Stunde später erreicht die sp. d. W. ihre Spitze. Wertung: Unabhängig.

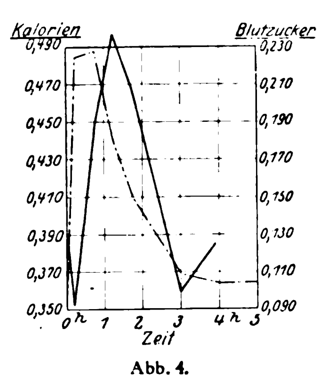


Abb. 4.

Maltose 4. Bei der hier beobachteten negativen Zacke der sp. d. W. fällt besonders der Gegensatz auf zu der schon voll erreichten B.-Z.-Höhe. Bei schon beträchtlich abgeklungenem B.-Z. von 0,150 ist die sp. d. W. noch deutlich ausgeprägt. Wertung: Unabhängig.

Maltose 5. Hier ist zum erstenmal ziemlich annähernde Parallelität vorhanden. Wertung: Gleichlaufend.

Maltose 6. Wiederum das bedeutend häufigere Bild. B.-Z.-Höchstwert zu einer Zeit, in der noch keine sp. d. W. vorhanden ist, und weiter umgekehrt bei deutlich ausgebildeter sp. d. W. annähernd normale B.-Z.-Werte (vgl. Abb. 1).

Bei der Lävulose (Versuch 2) ist eine deutlich verkürzte sp. d. W. festzustellen. Gemeinsamer Anstieg, aber früheres Abklingen der sp. d. W. vor dem Höhepunkt der Zuckerkurve, die sich wesentlich etwas länger höher hält.

Lävulose 3 gibt gemeinsame Anstiegwerte. Aber hier sinkt der B.-Z. deutlich schneller bei über 3 Stunden fortbestehender sp. d. W.

Lävulose 1. Dem energischen Anstieg der Zuckerwerte hält die sp. d. W. nicht Schritt. Erst bei normalen Zuckerwerten ist diese voll ausgebildet. Ihr Abfall ist langsamer. Die zuletzt beschriebene Beobachtung ist auch wieder die wertvollere, da sie eindeutig zeigt, daß durchaus keine Koppelung, wie man sie bei 2 und 3 für den Anfang doch noch annehmen könnte, besteht.

Man muß zu dem Schluß kommen, daß die sp. d. W. nicht notwendig Ausdruck ist für den Teil der assimilatorischen Phase, der es mit der Aufnahme der K.-H. aus dem Darm in die Chylus- und Blutgefäße zu tun hat. Aber auch der „Gewebereiz" des erhöhten Blut- bzw. Gewebezuckers ist nicht *direkt* für die sp. d. W. verantwortlich zu machen. Ein Blick auf den Abstand der entsprechenden Werte beim Traubenzucker zeigt ebenfalls, daß ein unbedingt gleichzeitig verlaufender Ablauf nicht vorhanden ist. Beim Versuch 1 ist der Unterschied beim fünften Teilversuch gut ersichtlich, während ebenfalls eine Spannung beim zweiten Versuch besteht, hier aber gerade in den Anfangswerten.

Zusammenfassung.

1. Untersucht man den Einfluß der Zufuhr von 100 g K.-H. auf den respiratorischen Stoffwechsel des nüchternen Menschen nach der *Zuntz-Geppert*schen Methode, so ergibt sich ein Mehrverbrauch, welcher durchschnittlich 1,15 bis 9,25 Proz. der mit den K.-H. zugeführten Kalorien entspricht. Versuche an Hunden mit entsprechenden K.-H.-Mengen zeigen ein gleiches Ergebnis. Den geringsten Mehrverbrauch verursacht von den untersuchten Stoffen Milchzucker, dann Traubenzucker, Maltose, Rohrzucker, Lävulose; am wirksamsten ist Stärke.

2. Der Mehrverbrauch (die „spezifisch-dynamische Wirkung") setzt in vielen Fällen, namentlich in den Versuchen mit Traubenzucker, schon wesentlich früher ein als die Verbrennung des Zuckers. Die sp. d. W. hat also nichts mit der dissimilatorischen Phase des K.-H.-Stoffwechsels zu tun.

Haupttabelle *).

Zeit	Zustand	Minuten-Volumen	CO_2	O_2	R.-Q.	Kalorien	Kaloriendifferenz	Spez.-dyn. Wirkg. Proz.
10. IX. 1926			Nr. 1. Untersuchungsobjekt: Dr. *Sch.*					
8h19′	nüchtern	5,13	182,9	245,5	0,745	1,1602		
8 29	„	5,37	191,3	241,8	0,791			
8 52	100 g Stärke	—	—	—	—	—	1,2270	
9 07	in 600 g Aqua	5,81	207,6	267,0	0,778	1,2747	1,4724	
							1,3779	
9 25		5,37	197,5	264,8	0,746	1,2537	2,1390	
							2,0890	
9 50		6,30	243,2	284,7	0,856	1,3863	3,4400	
							7,3288	
10 30		6,09	240,8	281,0	0,857	1,3689	3,3514	
							11,9886	
11 35		6,34	234,3	268,8	0,872	1,3114	2,4396	
							5,2479	
12 36		5,41	178,7	236,3	0.756	1,1220	0,1526	
							42,2492	+ 10,3
15. X. 1926			Nr. 2. Untersuchungsobjekt: Dr. *Sch.*					
8h00′	nüchtern	5,23	182,7	242,2	0,755	1,1492		
8 11	„	5,25	196,0	244,0	0,803	1,1726		
8 44–48′	100 g Stärke	—	—	—	—	—	0,1820	
9 00′	in 500 g Aqua	5,23	183,6	238,7	0,769	1,1370	0,2470	
	+ 3 Tabletten						1,0096	
9 18	Saccharin	5,54	219,3	275,2	0,797	1,3203	2,9558	
							1,8030	
9 42		5,66	220,9	259,5	0,851	1,2625	2,1196	
							5,0592	
10 27		5,92	233,5	261,6	0,813	1,2861	2,1000	
							8,0682	
11 30		5,64	221,1	257,6	0,858	1,2525	1,8382	
							6,6150	
12 23		5,65	216,0	253,8	0,851	1,2343	1,6016	
							33,5995	+ 8,2

*) Aus Sparsamkeitsgründen mußte von einer Wiederveröffentlichung der Versuche aus dem Schrifttum abgesehen werden, trotz des veränderten Aussehens durch die neue Berechnung. Deshalb sind ferner auch nur vier Kurven beigegeben worden.

Zeit	Zustand	Minuten-Volumen	CO_2	O_2	R.-Q.	Kalorien	Kalorien-differenz	Blutzucker	Zeit	Spez.-dyn. Wirk. Proz.
22. II. 1926.				Nr. 1. Untersuchungsobjekt: Dr. *Sch.*						
8h00'	nüchtern	4,67	181,8	239,4	0,759	1,1537				
8 26	"	4,61	188,9	245,7	0,768			0,117	9h10'	
9 14	100 g	—	—	—	—	—	0,5965			
9 24	Lävulose	5,73	212,9	253,8	0,838	1,2304	1,1334	0,150	9 35	
							1,9234			
9 45		6,32	258,4	264,2	0,978	1,3263	2,5824	0,155	9 59	
							0,3247			
10 14		6,58	244,7	256,0	0,955	1,2779	1,9182	0,152	10 28	
							10,0490			
11 00		7,10	284,6	308,2	0,923	1,5263	5,1900	0,112	11 15	
							17,7170			
12 34		5,14	202,5	233,8	0,866	1,1416	0,4423	0,096	12 51	
2 00		5,55	175,6	218,3	0,804	1,0492		0,098	2 20	
							41,8769			+ 10,2
7. I. 1926.			Nr. 2.	Untersuchungsobjekt: Wolfshündin, 16,3 kg.						
9h15'	nüchtern	2,07	63,8	86,4	0,738	0,4326				
9 46	"	2,36	73,0	96,2	0,759			0,070	10h20'	
10 30	35 g	—	—	—	—	—	1,1480			
10 46	Lävulose	3,08	97,1	109,1	0,906	0,5380	2,6189	0,097	11 10	
							1,9514			
11 20		3,19	91,9	101,1	0,908	0,4988	1,6949	0,102	11 40	
							1,6031			
12 00		2,83	79,8	85,7	0,931	0,4252	0,5219	0,094	12 25	
							0,8030			
12 37		2,61	74,3	92,4	0,804	0,4441	0,9300	0,088	1 00	
1 29		2,13	67,3	90,4	0,745	0,4279		0,086	1 55	
2 30		1,85	60,4	81,9	0,737	0,3869		0,080	2 55	
							11,2712			+ 7,8

Zeit	Zustand	Minuten-Volumen	CO_2	O_2	R.-Q.	Kalorien	Kalorien-differenz	Blutzucker	Zeit	Spez.-dyn. Wirk. Proz.
18. II. 1926.				Nr. 3. Untersuchungsobjekt Dr. *Sch.*						
7h57'	nüchtern	4,14	146,7	196,8	0,745	0,9214 (0,745–0,771)				
8 20	"	3,99	147,4	191,1	0,771			0,107	9h00'	
9 12	100 g	—	—	—	—	—	1,5698			
9 25	Lävulose	5,37	221,3	283,1	0,781	1,5326	3,3810	0,121	9 41	
							1,8130			
9 46		5,88	247,1	283,9	0,870	1,3876	3,3160	0,128	10 00	
							4,3537			
10 15		6,08	245,4	273,8	0,896	1,3468	2,9463	0,119	10 29	
							6,5549			
10 57		6,05	235,5	269,9	0,872	1,3198	2,7131	0,097	11 13	
							3,0566			
12 27		6,18	223,0	258,8	0,861	1,2620	1,8863	0,092	12 41	
							6,4073			
2 04		5,63	181,2	233,7	0,775	1,1115	0,0052	0,094	2 19	
							37,9996			+ 9,2
4. II. 1926.				Nr. 1. Untersuchungsobjekt: Dr. *Sch.*						
8h26'	nüchtern	5,63	178,0	225,0	0,790	1,0965 (0,790–0,802)				
8 41	"	5,57	186,2	232,1	0,802					
9 09	100 g	—	—	—	—	—	0,6213			
9 16	Rohrzucker	6,22	220,4	266,0	0,826	1,2886	2,1300			
							2,4888			
9 40		7,63	257,4	270,4	0,951	1,3484	2,3730			
							2,1438			
10 02		7,03	227,6	249,2	0,913	1,2311	1,3800			
							5,0848			
11 01		6,18	213,7	246,9	0,865	1,2052	1,1763			
							0,7319			
12 13		6,23	180,9	11,4	0,855	1,0293				
1 53		5,97	190,6	236,8	0,804	1,1381				
							18,1299			+ 4,4

Zeit	Zustand	Minuten-Volumen	CO_2	O_2	R.-Q.	Kalorien	Kalorien-differenz	Blutzucker	Zeit	Spez.-dyn. Wirk. Proz.
8. II. 1926.				Nr. 2. Untersuchungsobjekt: Dr. *Sch.*						
8h01'	nüchtern	5,00	193,1	255,3	0,756	1,2135				
8 18	"	4,97	193,2	256,1	0,754					
8 44	100 g	—	—	—	—	—	1,1276			
8 52	Rohrzucker	5,80	230,1	290,8	0,791	1,3930	3,8057			
							3,9982			
9 19		6,89	270,8	285,2	0,949	1,4215	3,4144			
							4,0040			
9 44		6,04	234,9	284,0	0,826	1,3727	3,2700			
							9,9154			
10 31		6,50	259,4	289,6	0,895	1,4243	3,7584			
12 01		5,38	192,4	264,2	0,728	1,2450				
12 58		6,06	199,1	251,2	0,792	1,2036				
							33,0937			+ 8,0
8. XII. 1925.			Nr. 1.	Untersuchungsobjekt: Pinscher, ♂, 14,45 kg.						
8h41'	nüchtern	2,00	54,5	76,8	0,709	0,3585				
9 03	"	2,00	54,5	76,0	0,714			0,084	9h25'	
9 36	50 g Maltose	—	—	—	—	—	0,5112			
9 52	in 250 g Aqua	2,38	68,5	86,9	0,788	0,4159	0,8467	0,166	10 17	
							1,0310			
10 25		2,36	66,8	81,4	0,817	0,3925	0,5468	0,185	10 47	
							0,7459			
10 58		2,42	70,2	79,0	0,889	0,3880	0.4320	0,185	11 15	
							0,7125			
11 25		2,51	74,1	83,8	0,884	0,4110	0,7375	0,173	11 45	
							3,0040			
12 31		2,43	70,4	83,5	0,843	0,4053	0,6396	0,145	12 53	
							3,2653			
1 30		3,14	79,3	88,8	0,893	0,4365	0,8450	0,124	1 47	
							13,3175			+ 6,5

Zeit	Zustand	Minuten-Volumen	CO_2	O_2	R.-Q.	Kalorien	Kalorien-differenz	Blutzucker	Zeit	Spez.-dyn. Wirk Proz.
14. XII. 1925.			Nr. 2.	Untersuchungsobjekt:	Pinscher, ♂,	14,25 kg.				
8h59'	nüchtern	2,29	55,3	74,9	0,737	0,3701				
9 18	"	2,47	61,1	31,5	0,750			0,070	9h45'	
9 49	35 g Maltose	—	—	—	—	—	0,7944			
10 13		2,81	72,2	86,3	0,836	0,4182	1,0927	0,137	10 27	
							0,3783			
10 38		2,48	64,2	77,5	0,828	0,3748	0,4218	0,184	11 00	
							0,9749			
11 28		3,86	70,7	71,7	0,886	0,3911	0,7429	0,188	12 03	
							2,0060			
12 30		2,97	71,7	83,3	0,861	0,4062	1,3279	0,182	12 58	
							1,6845			
1 31		2,80	70,8	79,4	0,811	0,3901	0,8573	0,093	2 00	
							1,4418			
2 32		2,81	66,5	80,4	0,828	0,3888	0,9568	0,061	3 07	
3 35		2,34	57,3	80,0	0,715	0,3757		0,060	4 05	
4 32		2,62	59,5	80,1	0,742	0,3789		0,052	4 55	
							12,6793			+ 8,8
14. I. 1926.			Nr. 3.	Untersuchungsobjekt:	Wolfshündin,	16,3 kg.				
8h49'	nüchtern	1,86	65,2	85,3	0,764	1,3961				
9 09	"	1,75	61,8	81,3	0,759			0,079	10h05'	
10 15	35 g Maltose	—	—	—	—	—	0,1288			
10 29		1,96	67,8	86,3	0,786	0,4129	0,3542	0,176	10 51	
							0,2894			
11 02		2,34	64,3	85,6	0,868	0,4182	0,3614	0,239	11 11	
							0,5364			
11 29		2,61	83,6	94,1	0,889	0,4621	1,3182	0,231	11 52	
							1,1187			
12 03		2,65	87,9	97,5	0,900	0,4801	1,6264	0,161	12 27	
							1,7028			
12 58		2,06	67,4	84,2	0,801	0,4004	0,2228	0,056	1 25	
2 01		1,99	61,0	82,5	0,739	0,3899		0,071	2 23	
3 00		1,92	57,3	76,0	0,754	0,3606		0,071	3 20	
3 51		2,00	57,8	72,1	0,749	0,3653		0,089	4 13	
							7,6511			+ 5,3

Zeit	Zustand	Minuten-Volumen	CO_2	O_2	R.-Q.	Kalorien	Kalorien-differenz	Blutzucker	Zeit	Spez.-dyn. Wirk. Proz.
18. I. 1926.			Nr. 4.	Untersuchungsobjekt:	Wolfshündin,	16,2 kg.				
8h19'	nüchtern	1,80	56,8	82,4	0,689	0,3906				
9 14	"	2,12	64,5	83,2	0,774			0,093	9h45'	
10 02	35 g Maltose	—	—	—	—	—	[— 0,2893]			
10 15		1,82	61,8	71,8	0,860	0,3500	[— 0,8678]	0,222	10 36	
							+ 0,0425			
10 45		2,38	82,0	90,7	0,904	0,4471	+ 0,6707	0,226	11 01	
							1,2447			
11 14		2,78	94,4	99,3	0,950	0,4951	1,5844	0,183	11 33	
							1,0713			
11 42		2,70	89,8	93,9	0,956	0,4688	1,5232	0,151	12 05	
1 01		1,92	57,4	75,3	0,762	0,3580		0,109	1 19	
1 51		1,85	62,6	80,4	0,779	0,3840		0,103	2 10	
2 53		1,67	56,9	85,0	0,673	—		0,103	3 16	
							+ 6,1368			
							— 1,1571			+ allein 4,2
							+ 4,9717			+ und — 3,5
21. I. 1926.			Nr. 5.	Untersuchungsobjekt:	Wolfshündin,	16,2 kg.				
2h00'	nüchtern	1,69	54,2	75,1	0,721	0,3590				
2 52	"	1,78	54,7	77,9	0,702			0,056	3h15'	
3 30	35 g Maltose	—	—	—	—	—	0,2717			
3 42		2,03	66,2	93,0	0,711	0,4363	0,5125	0,149	3 58	
							1,4872			
4 14		2,60	85,2	104,4	0,816	0,5033	1,8496	0,214	4 35	
							1,4760			
4 43		3,12	99,3	107,3	0,925	0,5317	2,3667	0,171	5 03	
							1,6396			
5 16		2,62	80,9	95,9	0,843	0,4655	1,1892	0,155	5 35	
							0,5802			
6 06		1,93	60,8	74,3	0,818	0,3584	—	0,077	6 30	
7 07		1,84	59,2	78,6	0,754	0,3729		0,060	7 36	
8 12		1,86	54,1	73,6	0,735	0,3475		0,058	8 28	
							11,3728			7,7

Zeit	Zustand	Minuten-Volumen	CO_2	O_2	R.-Q.	Kalorien	Kalorien-differenz	Blutzucker	Zeit	Spez.-dyn. Wirk. Proz.
29. I. 1926.				Nr. 6. Untersuchungsobjekt: Dr. *Sch.*						
8h29'	nüchtern	5,85	182,0	238,1	0,764	1,1413				
8 34		5,35	186,8	241,1	0,774			0,085	9h00'	
9 32	„ 100 g	—	—	—	—	—	0,2570			
9 42	Maltose	6,50	186,5	244,5	0,762	1,1625	0,3855	0,139	9 55	
							0,2736			
9 55		6,10	183,2	244,7	0,748	1,1592	0,5772	0,185	10 10	
							2,8288			
10 33		6,83	216,0	265,9	0,812	1,2806	1,8645	0,118	10 46	
							5,2586			
11 17		6,62	221,8	258,7	0,857	1,2603	1.6412	0,107	11 30	
							8,5104			
12 40		6,91	215,7	244,5	0,881	1,1983	0,9592	0,069	12 53	
2 17		5,95	186,8	238,5	0,783	1,1401		0,090	2 31	
3 00	Durchfall						22,5560			+ 5,5
11. II. 1926.				Nr. 1. Untersuchungsobjekt: Dr. *Sch.*						
8h07'	nüchtern	4,81	184,0	241.3	0,762	1,1391				
8 25	„	4,86	189,1	235,2	0,804			0,073	8h42'	
9 03	100 g	—	—	—	—	—	0,8394			
9 15	Rohrzucker	5,24	197,1	264,3	0,745	1,2510	1,9286	0,162	9 31	
							1,4476			
9 38		5,41	216,9	274,5	0,790	1,3118	2,7095	0,182	9 53	
							2,3000			
10 04		5,86	227,2	261,7	0,868	1.2784	2,0913	0,141	10 18	
							5,2447			
10 48		5,96	233,3	259,4	0,899	1,2769	2,1541	0,083	11 03	
							2,0313			
12 19		5,48	208,6	239,6	0,870	1,1711	0,8100	0,059	12 35	
2 00		5,24	195,5	252,3	0,774			0,073	2 16	
							21,5565			5,2

Zeit	Zustand	Minuten-Volumen	CO_2	O_2	R.-Q.	Kalorien	Kalorien-differenz	Blutzucker	Zeit	Spez.-dyn. Wirk. Proz.
13. II. 1926.				Nr. 2. Untersuchungsobjekt: Patientin *Kr.*						
8h29′	nüchtern	3,82	128,2	161,8	0,792	0,7701				
8 52	"	3,82	124,1	160,3	0,773			0,101	9h12′	
9 17	100 g	—	—	—	—	—	0,3165			
9 27	Dextrose	4,32	145,2	171,6	0,845	0,8334	1,1078	0,190	9 47	
							1,0890			
9 57		4,67	170,5	175,9	0,969	0,8811	1,8582	0,187	10 17	
							1,6788			
10 27		5,48	184,6	180,8	1,021	0,9126	2,0300	0,178	10 47	
							1,6999			
10 59		5,16	162,9	162,3	1,003	0,8192	0,7607	0,148	11 17	
							1,4455			
12 26		4,75	159,2	158,2	1,006	0,7985	0,4686	0,079	12 47	
							11,4550			2,8
19. VI. 1922.				Prof. *Bornstein.* Dextrose intravenös.						
9h04′		6,81	234,3	279,3	0,839	1,3544		0,091		
9h33—42′		Infusion				sof. danach		0,219		
9h44′		6,94	232,8	279,4	0,833	1,3525		0,191		
9 49		7,10	239,3	287,0	0,834	1,3900		0,161		
10 04		7,05	244,0	276,7	0,882	1,3565		0,140		
10 30		7,06	240,4	278,7	0,862	1,3594		0,119		
10 47		7,03	236,9	269,5	0,879	1,3202		0,098		

3. Es werden frühere Befunde unseres Instituts bestätigt, daß die Verbrennung der K.-H. unabhängig vom Verlauf der B.-Z.-Kurve ist.

4. In einigen Versuchen findet sich zweifellos ein gewisser Parallelismus zwischen Höhe des B.-Z. und Größe der sp. d. W. In häufigeren anderen Versuchen jedoch wird ein solcher Parallelismus vermißt, so daß ein Gewebereiz durch den Blutzucker als Ursache der sp. d. W. ausgeschlossen werden kann.

Literatur.

1) Handb. d. Biochem., 2. Aufl., **6**, 1926, „Die spez.-dyn. Wirkung der Nahrungszufuhr", S. 612, Rostock, E. Grafe. — 2) *A. Gigon*, Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **140**, 1, 1911. — 3) *Benedict* und *Carpenter*, Carnegie Inst. Public. 1918, S. 261. — 4) *A. Bornstein* und *Kurt Holm*, diese Zeitschr. **180**, 209, 1921. — 5) *Kurt Holm*, Zeitschr. f. exper. Med. **37**, H. 1/2. — 6) *O. Tögel, E. Brezina* und *A. Durigh*, diese Zeitschr. **50**, 296, 1913.

Analytische Mitteilungen. VI.

Von
Ludwig Pincussen.

Über die Bestimmung des Calciums im Serum.

Von
Paula Schimmelpfeng.

(Aus der biologisch-chemischen Abteilung des Städtischen Krankenhauses am Urban in Berlin.)

(Eingegangen am 8. Januar 1927.)

Die Frage, in welcher Weise das Calcium im Blut gebunden ist, wird auch neuerdings wieder eifrig diskutiert und dem „dialysablen“ und „adialysablen“ Anteil verschiedene biologische Wertigkeit zugeschrieben. Die für die Bestimmung angegebenen Methoden beruhen darauf, daß bei Dialyse unter bestimmten Bedingungen und in gewisser Zeit eine ziemlich konstante Menge als dialysabel gefunden wird. Für klinische Versuche, besonders an Kindern, sind diese Methoden nicht anwendbar.

Gerade solche Untersuchungen, die im Säuglingskrankenhause Berlin-Weißensee vorgenommen werden sollen, boten nun Veranlassung, der Frage näherzutreten, in erster Linie aber die verschiedenen gebräuchlichen Methoden zur quantitativen Bestimmung des Calciums im Blutserum nachzuprüfen und zu vergleichen. Hierbei war an die Möglichkeit zu denken, daß zwischen Fällbarkeit durch Oxalsäure und verschiedener Erscheinungsform des Calciums im Blute irgendwelche Beziehungen bestehen könnten. Es ergab sich sehr bald, daß die gewonnenen Werte nicht immer miteinander in Einklang zu bringen waren. Bestimmt man z. B. den Kalkgehalt eines Serums nach *Kramer* und *Tisdall*[1]), so findet man in vielen Fällen einen wesentlich niedrigeren Wert als bei

[1]) *Mandel* und *Steudel*, Minimetrische Methoden der Blutuntersuchung, 2. Auflage.



der Titration nach Veraschung des Serums im Mikrokjeldahlkolben [Methode von *Pincussen* und *Cronheim*[1])]. Die Unterschiede betragen bis zu 20 Proz. (Tabelle I).

Tabelle I.

Quantitative Bestimmung des Calciums im Serum.

	A. Methode *Kramer* und *Tisdall*		B. Veraschungsmethode *Pincussen* und *Cronheim*	
	mg-Proz.	mg-Proz.	mg-Proz.	mg-Proz.
a) Menschenserum . . .	6,9	7,3	9,0	9,0
b) Hammelserum	8,4	8,2	10,6	10,7

Nach der Methode von *Kramer* und *Tisdall* wird demnach, wenigstens beim Vorgehen in der üblichen Weise, nicht die gesamte im Serum enthaltene Calciummenge erfaßt. Zwei Ursachen könnten für diese Tatsache in Betracht kommen: entweder es gibt im unveraschten Serum Zustandsformen des Calciums, bei denen eine Ausfällung durch Ammoniumoxalat überhaupt nicht möglich ist — man könnte eine solche Erscheinungsform mit dem „adialysablen Calcium“ identifizieren —, oder aber es ist die von *Kramer* und *Tisdall* vorgeschriebene Wartezeit von 30 Minuten nach Zusatz der gesättigten Ammoniumoxalatlösung für die vollständige Fällung nicht ausreichend. Zur Klärung dieser Frage wurden mehrere Versuchsreihen durchgeführt. Die Ergebnisse sind aus Tabelle II ersichtlich.

Tabelle II.

Quantitative Bestimmung des Calciums im Serum.

Nr.	Serum	A. Methode *Kramer* und *Tisdall* Wartezeit nach Zusatz der gesättigten Ammoniumoxalatlösung					B. Veraschungsmethode *Pincussen* und *Cronheim*
		20 Min. mg-Proz.	32 Min. mg-Proz.	1 Stde. mg-Proz.	24 Stdn. mg-Proz.	48 Stdn. mg-Proz.	mg-Proz.
1	Hammelserum	6,4	9,2	10,3	12,4	—	12,2
2	Menschenserum	9,0	9,7	11,0	—	11,0	11,0
3	„	8,8	9,2	—	—	11,5	11,4
4	„	—	10,3	—	10,3	—	10,5
5	„	9,5	10,1	10,4	12,0	—	—
6	„	9,0	—	—	10,8	—	11,0

[1]) Mikrobestimmung von Ionen in Organen und ähnlichem Material. Diese Zeitschr. **171**, 7, 1926.



Es geht daraus hervor, daß die nach Methode A (*Kramer* und *Tisdall*) gefundenen Werte stets dann mit den nach Methode B (Veraschungsmethode nach *Pincussen* und *Cronheim*) festgestellten übereinstimmen, wenn die Wartezeit auf mindestens 24 Stunden verlängert wurde. Es wird also in 24 Stunden das *gesamte* Calcium des Serums ausgefällt. Ein gesetzmäßiges Ansteigen der Calciumwerte, entsprechend der Verlängerung der Wartezeit von 32 Minuten auf 1 Stunde, 24 Stunden und 48 Stunden, ist nicht zu erkennen. Bei Serum Nr. 4 ergab die Calciumbestimmung nach *Kramer* und *Tisdall* schon nach 32 Minuten Wartezeit den endgültigen Wert, während das Ergebnis bei Serum Nr. 1 und Nr. 5 noch nach 1 Stunde wesentlich hinter dem nach 24 Stunden Wartezeit festgestellten zurückblieb. Die Absicht, in einem Parallelversuch das Verhältnis des dialysierbaren Kalkanteils zum nicht dialysierbaren zu bestimmen und dadurch vielleicht das verschiedene Verhalten einzelner Seren zu erklären, scheiterte an den zur Verfügung stehenden, nicht kalkfreien Pergamenthülsen. Selbst nach gründlichem Auswässern dieser Hülsen wurden im Leerversuch noch 2 bis 5 mg Calcium festgestellt. Eine Klärung bleibt weiteren Untersuchungen auf anderem Wege oder mit anderem Material vorbehalten.

Hierbei sei erwähnt, daß die quantitative Bestimmung des Calciums im Blute nach der in der Mikromethodik von *L. Pincussen*[1]) veröffentlichten Anweisung bei Einhaltung von 16 Stunden Wartezeit nach Zusatz einer 3proz. Ammoniumoxalatlösung zuverlässige Werte ergibt. Bei dieser Methode ist also schon mit einer längere Zeit in Anspruch nehmenden Ausfällung des Calciumoxalats gerechnet.

Zusammenfassung.

Die nach der Methode von *Kramer* und *Tisdall* im Serum bestimmten Calciumwerte sind in vielen Fällen zu niedrig. Sie stimmen nur dann mit Sicherheit mit der nach Veraschung des Serums (Methode *Pincussen* und *Cronheim*) gefundenen Gesamtmenge überein, wenn statt der vorgeschriebenen Wartezeit von 30 Minuten nach Zusatz der Ammoniumoxalatlösung eine Wartezeit von 24 Stunden bis zum Zentrifugieren eingehalten wird. Unterschiede zwischen verschiedenen Erscheinungsformen des Calciums lassen sich mit der Fällungsmethode nicht klar erkennen.

[1]) 3. Auflage. Leipzig, Verlag von Georg Thieme, 1925.

Beiträge zur allgemeinen Biochemie komplizierter Salzlösungen.

I. Mitteilung:

Untersuchungen über die biologischen Wirkungen des Wiesbadener Thermalwassers.

Von

Karl Harpuder.

(Aus dem städtischen Forschungs-Institut für Bäderkunde und Stoffwechsel, Wiesbaden.)

(Eingegangen am 10. Januar 1927.)

Bisher hat man sich im großen und ganzen darauf beschränkt, die Einflüsse der Mineralwässer auf den Stoffwechsel oder sonstige Lebensäußerungen des Gesamtorganismus zu untersuchen, ohne freilich eindeutige Feststellungen machen zu können. Demgegenüber erschien es nicht ohne Interesse, sich einmal mit den allgemeinen physiologischen Wirkungen dieser kompliziert zusammengesetzten Salzlösungen zu beschäftigen. Zweierlei Vorteile konnten von derartigen Untersuchungen erwartet werden: 1. neue physiologische Erkenntnisse über die Wirkung von Salzkombinationen und einzelner, bisher wenig beachteter Bestandteile derselben; 2. Aufschlüsse über die allgemein-biologischen Wirkungen des vorliegenden Mineralwassers, die vielleicht auch imstande sein könnten, als Grundlage und Richtweiser für eine spätere Erforschung von Einflüssen auf den Gesamtorganismus zu dienen.

Die folgende erste Mitteilung hat zur Aufgabe, die physiologischen Eigenschaften und Eigenheiten des Wiesbadener Thermalwassers möglichst umfassend festzustellen, ohne daß zunächst der einzelne Effekt eingehender analysiert wird.

Die zahlreichen Thermalquellen Wiesbadens sind sehr ähnlich zusammengesetzt. Das Wasser enthält im Liter ungefähr 2,7 g $Na^{\cdot}$, 0,1 g $K^{\cdot}$, 0,35 g $Ca^{\cdot\cdot}$ und geringe Mengen $NH_4^{\cdot}$, $Sr^{\cdot\cdot}$, $Mg^{\cdot\cdot}$, $Fe^{\cdot\cdot}$ und Mangan. Von Anionen sind vorhanden 4,6 g Cl', 0,6 g HCO_3', in Spuren HPO_4'', NO_3', J', Br'. Ferner sind Borsäure, Kieselsäure, Arsensäure und Titansäure nachweisbar. Der Gehalt an freiem CO_2 beträgt etwa 0,3 g pro Liter.

Die nachstehenden Untersuchungen wurden an der Schützenhofquelle durchgeführt. Zum Vergleich gegenüber den Wirkungen des Thermalwassers diente Ringerlösung mit 0,9 Proz. NaCl, 0,02 Proz. KCl, 0,02 Proz. $CaCl_2$, 0,03 Proz. $NaHCO_3$. Die Reaktion beider Flüssigkeiten wurde, wo nötig, an der Gaskette mit Differenzen von $\pm p_H$ 0,03 auf die für den Versuch gewünschte Größe gebracht, wozu die freie CO_2 entfernt und öfter kleine

Mengen Salzsäure oder Natronlauge zugesetzt werden mußten. In manchen Fällen war es nötig, eine verdünnte, dem Thermalwasser isotone Ringerlösung zu verwenden. Die Versuche wurden stets mit frischem Thermalwasser angestellt, in dem eventuell sogar eine Spur *Kahlbaum*scher Stärke aufgelöst wurde, was sich im vorliegenden Falle bestens bewährte, um den Ausfall von Salzen zu vermeiden.

Zur Beobachtung wurde herangezogen der Einfluß des Thermalwassers auf:

1. Eiweißkörper (Albumin, Globulin, Casein),
2. Hämolyse durch lipoidlösliche Stoffe, Wärme, Hypotonie, $H^{\cdot}$ und OH',
3. Permeabilität von menschlichen Erythrocyten für Dextrose.
4. Ferment- und andere katalytische Prozesse,
5. Atmung und Gärung von Hefezellen,
6. Vermehrung von Hefezellen und Bakterien,
7. Phagocytose,
8. den quergestreiften Kaltblütermuskel.

Ich lasse nun eine Besprechung der gewonnenen Resultate folgen.

1. Einfluß des Thermalwassers auf Eiweißkörper.

Globulin wurde aus Rinderserum durch Halbsättigung mit Ammonsulfat gefällt, dreimal umgefällt und 14 Tage gegen fließendes Leitungswasser und destilliertes Wasser dialysiert. Der salzfreie Rückstand wurde im Thermalwasser zu einer Konzentration von etwa 3 Prom. gelöst und hiervon je 5 ccm mit steigenden Mengen n/20 und n/100 HCl versetzt. Maximale Flockung trat bei p_H etwa 5,1 in einer Fällungszone von p_H etwa 5,4 bis 4,7 auf. Die Reaktionen wurden an der Gaskette gemessen. Albumin wurde aus Rinderserum durch Sättigung mit Ammonsulfat gewonnen, im übrigen behandelt wie das Globulin. Von seiner etwa 3 prom. Lösung im Thermalwasser wurden je 5 ccm mit steigenden Mengen n/20 bzw. n/100 HCl gemischt. Dann wurde teils festgestellt, bei welchen Reaktionen durch Zusatz von 2 ccm 96 proz. Alkohol die stärkste Fällung hervorgebracht wurde, teils wurde die minimale Alkoholmenge ermittelt, die in den einzelnen Röhrchen noch Trübung hervorrief. Das Maximum der Instabilität fand sich bei p_H 6,2 in einem Flockungsbereich von p_H 6,3 bis 5,8. Eine 1 prom. Caseinlösung (*Hammarsten*) wurde so hergestellt, daß von einer 1 proz. Lösung in n/100 NaOH 1 ccm mit 9 ccm Thermalwasser verdünnt wurde. Je 10 ccm hiervon wurden mit n/10 und n/100 HCl titriert. Stärkste Fällung zeigte sich in einem Bereich von p_H 4,6 bis 4,3. *Die J. P. aller drei Eiweißkörper* werden also, wie wohl zu erwarten war, *durch das Thermalwasser verändert.*

2. Hämolyse.

Die Hämolyseversuche wurden durchwegs an menschlichen Erythrocyten angestellt. Das Blut wurde sehr vorsichtig defibriniert, der Körperchenbrei zweimal in der Zentrifuge mit Thermalwasser oder Ringerlösung gewaschen. Beide Salzlösungen hatten gleiches p_H und ein $\delta = -0{,}38^0$. Der Grad der Hämolyse wurde entweder in der salzsauren Lösung des Hämatins im *Autenrieth*schen Kolorimeter bestimmt oder zeitlich, indem der Eintritt vollständiger Auflösung festgestellt wurde. Wurden z. B. 0,2 ccm Blutkörperchenbrei in 12 ccm Thermalwasser und Ringerlösung suspendiert, bei Zimmertemperatur stehengelassen, nach 1 oder 2 Stunden ausgeschleudert und von der überstehenden Lösung 10 ccm mit 1 ccm n/1 HCl versetzt, gegen den in einem den Versuchsbedingungen entsprechenden Volumen aufgelösten, gesamten Blutkörperchenbrei kolorimetrisch verglichen, so ergab sich:

Zusatz	Versuchszeit	Thermalwasser p_H 7,42 $\delta = -0{,}38^0$ Proz. Lyse	Ringer p_H 7,44 $\delta = -0{,}38^0$ Proz. Lyse
0,1 ccm Chloroform	1^h	40	68
0,1 ccm Toluol	1	47	47
0,1 ccm Äther	1	47	46
3 ccm 96 proz. Alkohol . . .	1	37	10
4 ccm 10 proz. Urethan . . .	2	6	—
2 ccm 1 proz. Natr. cholalic.	2	100	16

Bei 2 Stunden langer Einwirkung einer Temperatur von 50° C betrug die Lyse im Thermalwasser 27 Proz., in Ringer 7 Proz.

Wurden die 0,2 ccm Blutkörperchenbrei in 12 ccm der beiden Salzlösungen (p_H 7,63; 7,60) suspendiert und nun nach Zusatz steigender Mengen von Chloroform der Zeitpunkt vollständiger Lyse bestimmt, so ergab sich:

Chloroformzusatz ccm	100 proz. Hämolyse im Thermalwasser	100 proz. Hämolyse in Ringer
0,05	nach 17^h noch nicht	nach 17^h
0,1	63′	47′
0,15	45,5′	31′
0,25	25′	18′
0,40	12′	7,5′
0,50	7′	5,5′

Es ist also die Verzögerung der Chloroformhämolyse im Thermalwasser bei verschiedener Chloroformkonzentration nachweisbar. Quantitativ stimmen übrigens die einzelnen Versuche mit Blutkörperchen verschiedener Menschen nicht überein, so daß nur Resultate am gleichen Material direkt vergleichbar sind.

In ähnlicher Weise zeigte sich, daß auch die Beschleunigung der Alkoholwirkung im Thermalwasser bei jeder Alkoholmenge vorhanden ist, soweit die Lyse nicht sofort und überhaupt noch nachweisbar auftritt.

Anders verhält sich wiederum Saponin (puriss. *Merck*), hier ist der Einfluß der Salze von der Menge des Hämolyticums abhängig. So wurde 0,1 ccm Blutkörperchenbrei in 10 ccm Quellwasser bzw. Ringer (mit p_H 7,62 und $\delta = -0{,}38^0$) von 0,4 und 0,35 ccm 0,2 proz. Saponinlösung in 135 bzw. 95 Sekunden vollständig aufgelöst, bei 0,25 und 0,20 ccm war die Lyse ungefähr gleich und bei 0,1 ccm Saponin verlief sie im Thermalwasser um etwa 20 Proz. schneller als in Ringer.

Die Hypotonieresistenz der roten Blutkörperchen im Thermalwasser wurde geprüft, indem fallende Mengen desselben mit destilliertem Wasser auf 5 ccm ergänzt und mit 0,1 ccm Blutkörperchenbrei gemischt wurden. Nach 2 Stunden Stehen bei Zimmertemperatur wurde ausgeschleudert. Entsprechende Verdünnungen des Quellwassers ohne Zusatz von Erythrocyten wurden zur Gefrierpunktsbestimmung herangezogen.

Es fand sich beginnende Hämolyse bei $\delta = -0{,}260^0$, $-0{,}255^0$, $-0{,}260^0$. Vollständige Auflösung wurde festgestellt bei $\delta = -0{,}200^0$, $-0{,}190^0$, $-0{,}195^0$. p_H war in diesen Versuchen 7,36 bis 7,62. In Ringer fanden sich entsprechende Werte von $-0{,}270$ bis $0{,}275^0$ und $-0{,}210^0$.

Die Auflösung der roten Blutkörperchen durch $H^{\cdot}$ und OH' wurde gemessen, indem 12 ccm der beiden Salzlösungen von gleicher Reaktion und gleichem δ mit 0,2 ccm Blutkörperchenbrei und mit steigenden Mengen n/5 HCl und n/5 bzw. n/1 NaOH versetzt wurden. Nach 2 Stunden wurde ausgeschleudert, auf gleiches Volumen aufgefüllt, 5 ccm der Flüssigkeit zur Kolorimetrie verwendet. im Rest p_H bestimmt. Aus vier Versuchen ergibt sich im Mittel, daß die Hämolyse im Thermalwasser bei p_H etwa 6,4 beginnt, bei p_H etwa 4,8 vollständig ist, auf der alkalischen Seite tritt Hämolyse bei p_H etwa 9,7 bis 9,8 auf. In Ringer sind die entsprechenden Reaktionen p_H 6,1 bzw. 4,6 bzw. 9,90 bis 10,0.

Thermalwasser.

n/5 HCl	0,25	0,30	0,325	0,35	0,375	0,40	0,425
Proz. Lyse .	—	Spur	8—10		40	70	100
p_H	6,5	6,38	6,2	—	6,08	5,4	4,8

n/5 bzw. n/1 NaOH	0,25	0,5	0,10	0,11	0,12	0,14	0,15
Proz. Lyse .	—	—	Spur	20	40	90	100
p_H	—	—	9,72	9,98	10,15	—	10,43

Ringer.

n/5 HCl	0,125	0,150	0,175	0,20	0,225	0,250	0,275
Proz. Lyse .	Spur	10—15	30	40	80	100	100
p_H	6,13	5,96	—	5,3	4,87	4,58	—

n/5 NaOH	0,175	0,20	0,225	0,250	0,275	0,30	0,325
Proz. Lyse .	—	Spur	etwa 10	40	80—90	100	100
p_H	—	9,98	10,15	—	10,28	10,46	—

Im ganzen ergibt sich aus den vorstehenden Versuchen erneut, *wie stark die Hämolyse durch Salze beeinflußt* wird und daß die *gleiche Salzkombination verschiedene Lytica*, und zwar auch solche, denen man geneigt wäre, gleiche Angriffspunkte an der Plasmahaut zuzuschreiben, wie Chloroform, Äther, Alkohol, *in ihrer Wirkung verschieden verändert.*

3. Permeabilität der Erythrocyten.

Untersucht wurde lediglich die Aufnahme von Traubenzucker aus den beiden Salzlösungen — Thermalwasser und Ringer — nach Dextrosezusatz und die Abgabe von Dextrose durch Erythrocyten an die zuckerfreien Lösungen. Ob es sich im ersten Falle um Adsorption des Zuckers an die Blutkörperchen oder um Durchtritt desselben handelt, wurde nicht berücksichtigt. Zur Verwendung kamen menschliche Blutkörperchen aus Citratblut, die dreimal mit physiologischer NaCl-Lösung gewaschen wurden. 1 ccm Blutkörperchenbrei wurde mit 2 ccm Salzlösung vermischt, die zuckerfrei war oder bis 0,3 Proz. Dextrose enthielt, und der Zuckergehalt der Erythrocyten, eventuell der Lösung, und der gesamten Mischung sofort und nach 2 Stunden langem Stehen im Eisschrank (zur Hintanhaltung der Glykolyse) nach *Hagedorn-Jensen* bestimmt. Die Resultate waren im Quellwasser und in Ringer sowohl für Aufnahme wie für Abgabe der Dextrose annähernd — mit Differenzen von einigen Prozenten — gleich.

4. Ferment- und andere katalytische Prozesse.

Daß die Wirkung vieler Fermente wesentlich von dem anorganischen Milieu abhängt, in dem sie sich befinden, ist längst bekannt. Freilich ist es nicht entschieden, ob es sich dabei um Beeinflussung von Begleitstoffen oder der Fermente selbst handelt, häufig dürfte wohl das erste der Fall sein. Die Wichtigkeit der Salze für die Fermente ist damit auch keineswegs in Frage gestellt, da die Fermente in natürlichem Zustande immer an Begleitstoffe gebunden sein dürften. Besonders deutlich ist der Salzeffekt bei Amylasen und Katalasen. Der Einfluß

des Thermalwassers auf wasserstoffsuperoxydzerlegende Fermente kann nicht untersucht werden, da es selbst katalytisch wirkt, wie von *L. Fresenius* kürzlich gezeigt worden ist. Deutlich unterscheidet sich dagegen die Wirksamkeit der *Speichel-* und *Pankreasdiastase* im Quellwasser von der in Ringerlösung.

Dialysiert man menschlichen Speichel 48 Stunden gegen destilliertes Wasser, verdünnt mit Wasser 1 : 200, bringt je 5 ccm Fermentlösung mit 2 ccm 2proz. Lösung *Kahlbaum*scher Stärke und je 20 ccm Thermalwasser und Ringer zusammen und verfolgt den Stärkeabbau durch die Jodreaktion (2 ccm n/1000 Jod), so zeigt sich bei p_H 6,06 die Diastasenwirkung im ersten um etwa 25 Proz. stärker als im zweiten. Das Reaktionsoptimum liegt für die Speicheldiastase in Thermalwasser bei p_H 6,8 bis 6,6, die Wirkung fällt langsam nach der sauren und alkalischen Seite ab, so daß bei p_H 6,27 noch fast optimaler Abbau stattfindet. In Ringer ist die optimale Reaktion ziemlich scharf bei p_H 5,87 bis 5,99.

Als Pankreasdiastase kam ein Trockenpräparat von *Freund* und *Redlich* zur Verwendung, das nur kurze Zeit gelöst haltbar war und deshalb nicht dialysiert werden konnte. 0,1 g Fermentpulver wurde mit Wasser angerieben, auf 50 ccm gebracht und ¼ Stunde geschüttelt. Die Ansätze entsprachen denen bei der Speicheldiastase. Nach ein- und zweistündigem Stehen bei Zimmertemperatur wurde die Jodreaktion angestellt. p_H im Thermalwasser 6,81, in Ringer 6,76. Der Abbau ist im Thermalwasser um etwa 30 Proz. stärker. Optimale Fermentwirkung für das Quellwasser bei p_H 6,5 bis 6,4 mit allmählichem Abfall auf der sauren, etwas rascherem Rückgang auf der alkalischen Seite. In Ringer optimaler Abbau bei p_H 6,9 bis 7,1.

Auch *Pepsin* erwies sich als beeinflußbar. Von einem *Grübler*schen Trockenpräparat wurden 2- und 4proz. Lösungen hergestellt. Casein *Hammarsten* wurde 2proz. in n/1 HCl gelöst. 40 ccm Thermalwasser und Ringerlösung wurden mit 10 ccm Caseinlösung und 5 ccm Fermentlösung versetzt und 1 bis 3 Stunden bei 40° im Brutschrank gehalten. Danach wurden 5 ccm des Gemisches mit 3 ccm gesättigter Sublimatlösung und 2 ccm n/1 HCl enteiweißt und mit 5 ccm Filtrat der Rest-N durch Mikrokjeldahl bestimmt. Die Reaktion variierte in vier Versuchen zwischen p_H etwa 1,5 bis etwa 3,6. Bei letzterer Reaktion war kein sicherer Abbau nachweisbar. Bei p_H etwa 1,5 bis etwa 2,5 war der Abbau im Thermalwasser um 28 bzw. 22 bzw. 18 Proz. größer als in Ringer. So betrug der Rest-N in einem Versuch mit p_H 1,64 bzw. 1,66 sofort 2,52 mg-Proz., nach 3 Stunden im Quellwasser 35,70 mg-Proz., in Ringer 27,76 mg-Proz.

Die *tryptischen Wirkungen* des vorhin genannten Pankreatinpräparats unterschieden sich dagegen in den beiden Salzlösungen nicht wesentlich. Die Versuchsanordnung war wie beim Pepsin. 2proz. Fermentlösung, 2proz. Caseinlösung in n/100 NaOH, p_H 7,27, Rest-N bei Beginn 8,32 mg-Proz., nach 2 Stunden im Thermalwasser

23,4 mg-Proz., in Ringer 21,4 mg-Proz. In einem weiteren Versuch, p_H 7,53 bzw. 7,57, Rest-N sofort 11,76 mg-Proz., nach 3 Stunden im Thermalwasser 34,9 mg-Proz., in Ringer 36,7 mg-Proz. Ähnlich um geringe Werte differierende Resultate ergaben zwei weitere Versuche.

Zur Untersuchung der *Serumlipase* wurden Thermalwasser und Ringer von p_H 7,42 bzw. 7,44 mit Tributyrin, je 20 Tropfen auf 20 ccm, 1/4 Stunde geschüttelt, filtriert und 18 ccm der Lösungen mit 2 ccm Serum angesetzt. Die Tropfengröße wurde sofort und nach Stehen bei Zimmertemperatur mit dem *Traube*schen Viskosistagonometer gemessen. So ergab sich z. B. für jeden Tropfen eine durchschnittliche Größe von:

	Sofort	Nach 2 Std.	Nach 4 Std.
Thermalwasser	63	70	80 Teilstrichen
Ringer	63	65	72 „

Mit zwei anderen Seren wurden ähnliche Werte erhalten, in zwei weiteren Fällen waren die Abbauunterschiede nur angedeutet, so daß die Tropfengröße z. B. im Quellwasser von 64 auf 77, in Ringer von 63 auf 74 in 4 Stunden zunahm. Immerhin ist in allen untersuchten Fällen — fünf — eine verstärkte lipolytische Funktion des Serums unter dem Einfluß der Mineralwassersalze nachweisbar gewesen.

Kein Unterschied war dagegen für die *Hämoglykolyse* festzustellen. Menschliches Blut wurde vorsichtig defibriniert, die Blutkörperchen einmal mit physiologischer NaCl-Lösung gewaschen und 1 ccm Erythrocytenbrei mit 2 ccm der beiden Salzlösungen von p_H 7,44, die jeweils einen Zusatz von 0,150 Proz. Dextrose bekamen, gemischt. Sofort und nach 4 Stunden Bebrütung bei 40° wurde der Gesamtzuckergehalt nach *Hagedorn-Jensen* bestimmt. So ergab sich

sofort im Thermalwasser 0,166 Proz., nach 4 Stunden 0,088 Proz.
in Ringer 0,163 „ „ 4 „ 0,086 „

oder

sofort im Thermalwasser 0,139 Proz., nach 4 Stunden 0,090 Proz.
in Ringer 0,138 „ „ 4 „ 0,087 „

Angesichts der auf dem Gehalt an Ferro- und Manganoionen beruhenden *katalytischen Wirkungen* des Wiesbadener Thermalwassers lag es nahe, zu versuchen, ob es auch als O_2-Überträger funktionieren könne. Uns interessierte von den vielen Wegen die zur Entscheidung dieser Frage gangbar waren, vor allem der *Einfluß des Quellwassers auf die Oxydation von Aminosäuren an Tierkohle.* Suspendiert man nun 0,50 g *Merck*scher Tierkohle in 10 ccm Thermalwasser und Ringer mit 1 Proz. Glykokoll, bringt in *Barcroft*-Manometer (modifiziert nach

4*

Warburg und *Negelein*), durchlüftet mit O_2 und bestimmt unter Absorption der CO_2 durch Kalilauge die Sauerstoffzehrung, so ist zwar eine Steigerung des O_2-Konsums im ersten Falle unverkennbar, aber sie ist recht gering. Anders, wenn man Tierkohle, etwa 1 g auf 200 ccm, mit dem frischen Quellwasser schüttelt, filtriert, den Rückstand im Trockenschrank bei 150° etwa 1 Stunde trocknet und nun gegen eine mit Ringerlösung in gleicher Weise behandelte Kohle vergleicht. Dabei muß darauf geachtet werden, daß die Erhitzung der beiden Kohlesorten nach Temperaturhöhe und Dauer für den einzelnen Versuch dieselbe ist, da sonst große Unterschiede in der Oxydationskraft entstehen können.

	Lösung	O_2-Konsum in 30 Min. cmm	O_2-Konsum in 60 Min cmm		Lösung	O_2-Konsum in 30 Min. cmm	O_2-Konsum in 60 Min. cmm
1	Thermalwasser	92,86	167,04	3	Thermalwasser	94,34	184,25
1	"	86,94	162,29	3	"	105,77	199,96
1	Ringer	35,17	62,69	3	Ringer	42,46	76,75
1	"	28,88	62,86	3	"	36,21	72,42
2	Thermalwasser	107,62	223,21	4	Thermalwasser	101,24	215,54
2	"	131,04	267,84	4	"	101,94	217,46
2	Ringer	29,34	68,59	4	Ringer	32,92	85,58
2	"	24,69	51,03	4	"	29,48	73,70

p_H war im ersten Versuch 7,03 bzw. 7,07, im zweiten Versuch 6,85, ebenso im dritten, im vierten 7,01 bzw. 7,03. Jeder Ansatz bestand aus 10 ccm Thermalwasser oder Ringerlösung mit n/5 Glykokoll und 0,5 g in der oben angegebenen Art präparierter Tierkohle. Die Oxydation erfolgte in reiner O_2-Atmosphäre bei 37° unter Absorption der CO_2 durch Kalilauge im *Barcroft*-Manometer bei ständiger, gleichmäßiger Schüttelung.

Aus den Versuchen geht hervor, daß die *Präparation der Tierkohle mit frischem Thermalwasser* eine erhebliche *Steigerung ihrer Oxydationskraft* gegenüber Glykokoll, damit wohl überhaupt gegenüber Aminosäuren bewirkt. Mit Untersuchungen über die Oxydationen des Cysteins, der Fructose, die nach *Warburg* Eisenkatalysen sind, der Methylenblaureduktion im Thermalwasser befaßt sich das Laboratorium von Dr. *Fresenius*, Wiesbaden.

5. Atmung und Gärung von Hefezellen.

Die Steigerung der Verbrennungsprozesse an Tierkohle erlaubt natürlich keine Rückschlüsse auf den Einfluß der Salze bei Oxydationsvorgängen in der Zelle. Um darüber Aufschluß zu erhalten, wurden Versuche über die *Atmung von Hefezellen* im Thermalwasser und in

Ringer von gleichem p_H und mit Zusatz gleicher Dextrosemengen angestellt. Diese Versuchsanordnung schien brauchbar, wenn auch die künstlich gezüchtete Hefe immer neben der Atmung einen lebhaften anaeroben Stoffwechsel betreibt.

Gewöhnliche Bäckerhefe wurde dreimal auf der Zentrifuge mit 0,9 proz. NaCl-Lösung gewaschen, dann wurde eine etwa 1 proz. Suspension hergestellt und geschüttelt. In *Negelein*sche Ansatzgefäße für *Barcroft*-Manometer wurden 9 ccm Thermalwasser bzw. Ringer mit einem Gehalt von 0,2 Proz. Dextrose und 1 ccm Hefeaufschwemmung eingefüllt, mit O_2 durchlüftet und nun in üblicher Weise im Schüttelthermostaten bei 26° unter Absorption der CO_2 durch Kalilauge die Sauerstoffzehrung gemessen.

	Lösung	O_2-Konsum in 15 Min. cmm	O_2-Konsum in 45 Min. cmm		Lösung	O_2-Konsum in 15 Min. cmm	O_2-Konsum in 45 Min. cmm
1	Thermalwasser	88,88	266,65	2	Ringer	80,77	213,98
1	„	88,44	274,16	2	„	79,59	228,47
1	Ringer	81,65	230,25	3	Thermalwasser	101,25	298,74
1	„	76,46	219,17	3	„	98,76	291,34
2	Thermalwasser	94,71	305,37	3	Ringer	52,67	149,51
2	„	91,55	286,74	3	„	51,59	155,29

Die Reaktion betrug im ersten Versuch p_H 4,56 bzw. 4,53, ebenso im zweiten Versuch, beim dritten Versuch dagegen p_H 7,4.

Ähnliche Resultate wurden in drei weiteren Versuchen unter den gleichen Bedingungen erzielt. Die Oxydationssteigerung an Hefe, die das Thermalwasser gegenüber der Ringerlösung hervorruft, ist bei der in üblicher Weise angewendeten sauren Reaktion zwar deutlich, aber keineswegs sehr erheblich. Dagegen ist bei eben alkalischem Milieu eine Erhöhung des O_2-Konsums um etwa 100 Proz. nachweisbar, ein sehr interessantes Ergebnis, das noch eingehenden Studiums bedarf.

Daß die *Gärungsprozesse der Hefe* von Salzen beeinflußt werden, ist bekannt und wiederholt untersucht worden. Wir beobachteten die Einwirkung des Quellwassers auf Hefegärung im Vergleich zu Ringer bei folgender Versuchsanordnung:

0,1 g Bäckerhefe wurde mit 10 ccm Quellwasser oder Ringer zweimal auf der Zentrifuge gewaschen und dann in 10 ccm der entsprechenden Flüssigkeit suspendiert. 0,2 ccm dieser Aufschwemmungen wurden mit 0,8 ccm Thermalwasser bzw. Ringer von gleichem p_H in Manometergefäße nach *Negelein* eingebracht. Je 1 ccm 25proz. Dextroselösung in Quellwasser oder Ringer kam in die Birne der Gefäße. Die Manometer wurden zusammengesetzt, mit CO_2 durchlüftet und im Schüttelthermostaten bei 26° nach Eintritt des Temperaturausgleiches zunächst die Eigengärung bestimmt. Hierauf wurde die Dextrose in die Gefäße eingekippt. Die jetzt gemessene CO_2-Produktion war z. B.

	Lösung	CO_2-Produktion in 30 Min. cmm	CO_2-Produktion in 60 Min. cmm		Lösung	CO_2-Produktion in 30 Min. cmm	CO_2-Produktion in 60 Min. cmm
1	Thermalwasser	93,82	197,52	2	Ringer	56.42	98.12
1	"	99,19	210,12	2	"	55,63	98,30
1	Ringer	70,95	137,17	3	Thermalwasser	104,03	198,69
1	"	68,26	141,85	3	"	108,52	212,43
2	Thermalwasser	75,94	148,14	3	Ringer	66,66	130,86
2	"	70,41	144,26	3	"	75,68	151,36

Die Reaktion der Lösungen schwankte zwischen p_H 4,5 und 4,6.

Ersichtlich verläuft die Hefegärung bei Ausschluß von O_2 im Thermalwasser erheblich — rund um 50 Proz. — stärker als in Ringer. Es ist zunächst auffallend, daß die gleiche Salzlösung sowohl Atmung als Gärung der Hefe erhöht, während sonst oxydationssteigernde Einflüsse die anaerobe Energieproduktion zu hemmen pflegen und umgekehrt. Doch angesichts der komplizierten Zusammensetzung des Quellwassers ist die Annahme gerechtfertigt, daß bestimmte Bestandteile den einen, andere den zweiten Prozeß steigern. Dafür soll später der Beweis versucht werden.

6. Vermehrung von Hefezellen und Bakterien.

An Hand dieser stimulierenden Wirkung des Thermalwassers auf den Stoffwechsel der *Hefe* lag die Vermutung nahe, daß auch das Wachstum und die *Vermehrung* derselben beeinflußt werden könnte. Um darüber Aufschluß zu bekommen, wurde wieder Bäckerhefe dreimal auf der Zentrifuge mit Quellwasser bzw. Ringer gewaschen und dann wurden dünne Suspensionen derselben in den beiden Flüssigkeiten hergestellt, die in einem Versuch z. B. ein p_H von 7,46 bzw. 7,45 und einen Dextrosegehalt von 0,150 Proz. hatten. Die Zellzahl wurde sofort in einer *Thoma-Zeiss*schen Leucocytenkammer ausgezählt und war im Durchschnitt von drei Zählungen im Thermalwasser 700 pro Kubikmillimeter, in Ringer 625 pro Kubikmillimeter. Die Ansätze blieben 24 Stunden bei Zimmertemperatur stehen, dann wurde gründlich durchgeschüttelt und wieder gezählt. Jetzt fanden sich im Thermalwasser 1675 pro Kubikmillimeter, in Ringer 925 Zellen pro Kubikmillimeter. In einem weiteren Versuch mit p_H 7,54 und 1 Proz. Dextrose betrugen die Anfangszahlen für Thermalwasser 550, für Ringer 775 Zellen pro Kubikmillimeter, die Werte nach 24 Stunden: 1525 bzw. 1100, nach 48 Stunden: 2300 bzw. 1450. Die Vermehrung in 48 Stunden beträgt also im Quellwasser etwa 418 Proz., in Ringer etwa 174 Proz. des Ausgangswertes. Ähnliche Differenzen in der Hefevermehrung wurden in zwei weiteren Versuchen festgestellt, in einem letzten bei

p_H 7,7 erreichte das Wachstumsplus zugunsten des Thermalwassers dagegen nur 34 Proz. Die Vermehrung war dabei im ganzen gering, sie machte in 48 Stunden 164 bzw. 130 Proz. der Ausgangszahlen aus.

Die Stimulierung der Hefevermehrung durch die Quellsalze ist jedenfalls deutlich. Es interessierte deshalb, ob auch die Propagation anderer Pilze beeinflußt werden kann, um so mehr, als *Baudisch* und *Welo* derartige Wirkungen bei katalytisch wirksamem Eisen, wie es in den Wiesbadener Quellen vorhanden ist, für einige Bakterien festgestellt haben. Ich untersuchte das Verhalten von Bac. Paratyph. B. und Bact. coli comm.

5 g Standardnährbouillon nach *Kuczynski* werden in etwa 40 ccm Wasser gelöst und 24 Stunden gegen fließendes Leitungswasser, dann weitere 24 Stunden gegen häufig erneuertes destilliertes Wasser dialysiert. Hierauf wird die Bouillon im Autoklaven sterilisiert. Je 10 ccm der Bouillon kommen zu 40 ccm Quellwasser bzw. Ringer von p_H 7,4, die in sterilen Kolben aufgefangen bzw. aus sterilisiertem Wasser bereitet waren. In Reagenzgläsern werden 10 ccm der beiden Bouillonverdünnungen mit 0,25 ccm einer Aufschwemmung aus Reinkulturen von Paratyphus- oder Kolikeimen gemischt und 24 Stunden bei 40° bebrütet. Danach wurde die Bouillon mit 0,9proz. NaCl-Lösung zehnfach verdünnt und in der Erythrocytenkammer ausgezählt.

Wie sich aus drei derartigen Doppelversuchen ergab, erfolgte die Keimvermehrung in beiden Salzlösungen (innerhalb der nicht unbeträchtlichen Fehlergrenzen) gleichmäßig.

7. Phagocytose.

Seit langem ist uns — besonders durch die *Hamburger*schen Untersuchungen — bekannt, daß die Aufnahme von Fremdkörpern durch Leucocyten vom anorganischen Milieu abhängig ist, daß sie von Kalksalzen befördert wird und daß so auch die Phagocytose in einem kalkreichen Mineralwasser z. B. stärker ist als in einer physiologischen NaCl-Lösung. Im folgenden ist die Phagocytose im Wiesbadener Thermalwasser mit einer isotonen Ringerlösung verglichen.

Tierkohle wurde getrocknet und im Achatmörser verrieben. 0,5 g werden mit 20 ccm Quellwasser bzw. Ringerlösung geschüttelt, dann für mehrere Stunden der Sedimentierung überlassen. Wenn die überstehende Flüssigkeit makroskopisch keine Partikel mehr erkennen läßt, wird sie abgehoben, bleibt nochmals 1 bis 2 Stunden stehen. Mikroskopiert man, so sollen sich jetzt nur wenige Teilchen von mehr als Erythrocytengröße finden. Man verdünnt mit der entsprechenden Salzlösung auf ungefähr gleiche Partikelzahl. Die Leucocyten wurden teils aus frischem Eiter[1]), teils aus Blut nach *Szillard*[2]) dargestellt, was nicht jedesmal gelang. 10 ccm der kohleteilchenhaltigen Salzlösungen wurden mit 0,2 ccm Eiterbrei

[1]) Durch dreimaliges Waschen mit physiologischer NaCl-Lösung.
[2]) Arch. f. ges. Physiol. **211**, 597, 1926.



gemischt und in *Barcroft*-Manometer mit Gefäßen nach *Negelein* eingebracht, die Gefäße mit O_2 durchlüftet und nun bei 37° im Schüttelthermostaten geschüttelt. Die Leucocytenzahl und die Zahl der Kohleteilchen wird am Beginn, die Zahl der beladenen Leucocyten und der nicht phagocytierten Partikel nach ein- oder zweistündigem Schütteln festgestellt. Beide Salzlösungen haben Blutreaktion und ein $\delta = -0{,}38°$. So ergaben sich folgende Werte:

Lösung	Leucocyten im cmm	Kohleteilchen im cmm	Beladene Leucocyten im cmm	Freie K.-Teilchen im cmm
Thermalwasser	1205	1080	425	435
Ringer	1135	990	325	610
Thermalwasser	2340	1420	870	240
Ringer	2180	1385	580	450

Die Steigerung der Phagocytose zeigte sich ebenso deutlich in zwei weiteren Versuchen unter entsprechenden Bedingungen.

8. Verhalten des quergestreiften Kaltblütermuskels.

Endlich erschien es noch prüfenswert, wie sich die Kontraktion des quergestreiften Kaltblütermuskels im Thermalwasser im Vergleich zu einer Ringerlösung abspielen würde, letztere mit 0,65 Proz. NaCl. Zur Untersuchung kamen Gastrocnemien von Esculenten, die Versuchsanordnung war die übliche. Verglichen wurden immer die beiden Muskeln der gleichen Tiere, die zunächst beide in Ringer kamen, nach ¼ Stunde wurde dann der eine Muskel ins Thermalwasser überführt. Bei Reizung mit einzelnen Induktionsschlägen (alle 5 bis 10 Minuten) erwies sich Hubhöhe und Zuckungsablauf während einer Versuchsdauer von 1½ bis 3 Stunden als gleich. Auch beim Tetanus und bei Reizung bis zur Ermüdung konnten verwertbare Unterschiede nicht nachgewiesen werden.

9. Ergebnisse.

Aus allem Berichteten geht hervor, daß es sich beim Wiesbadener Thermalwasser nicht um eine „nahezu physiologische Salzlösung" handelt, wie angenommen wurde. *Die physikalisch-chemischen Eigenschaften der untersuchten Biokolloide, die Funktionen der Plasmahaut, die Wirkung von einigen Fermenten, der Stoffwechsel der Hefe, einige andere Lebensäußerungen* von Zellen, wie *Vermehrung der Hefe, Phagocytose,* werden *vom Quellwasser* deutlich *in unphysiologischer Weise beeinflußt,* während sich allerdings nicht wenige *andere Vorgänge* in ihm so abspielen, *wie im physiologischen Milieu* der Ringerlösung. So entsteht ein wenig einheitliches, recht *kompliziertes Bild der biologischen Wirkungen des Thermalwassers,* was bei seiner komplizierten Zusammensetzung nicht weiter wunderzunehmen braucht. Eine

schematische Charakterisierung des Quellwassers nach dem einen oder anderen Bestandteil, wie sie bisher häufig erstrebt wurde, etwa als Kochsalzquelle oder dergleichen, erscheint jedenfalls höchst untunlich. Es wird unsere weitere Aufgabe sein, die durch die vorstehenden Untersuchungen gewonnene Übersicht über die physiologischen Eigenschaften einer vielartig zusammengesetzten Salzlösung zu erweitern und zu vertiefen und die einzelnen Beobachtungen nach Ursache und Ablauf zu analysieren.

Zusammenfassung.

Es wird gezeigt, daß das Wiesbadener Thermalwasser den J. P. des Albumins, Globulins und Caseins verschiebt, daß es die Lyse roter Blutkörperchen durch eine Reihe auflösend wirkender Eingriffe anders beeinflußt als eine Ringerlösung, daß es gegenüber der letzteren die Wirkung der Amylase, des Pepsins, der Serumlipase steigert. Die Verbrennung von Aminosäuren an Tierkohle, die Oxydation und Gärung der Hefe wird erhöht, ebenso die Vermehrung der Hefe. Die Phagocytose ist im Thermalwasser stärker als in Ringer. Die Permeabilität von Erythrocyten für Dextrose, die Trypsinwirkung, die Hämoglykolyse, die Vermehrung von Bact. coli und Paratyphus B. ist in beiden Salzlösungen annähernd dieselbe. Froschgastrocnemien verhalten sich ebenfalls in beiden Milieus anscheinend gleich.

Beiträge zur allgemeinen Biochemie komplizierter Salzlösungen.

II. Mitteilung:

Untersuchungen über die biologischen Wirkungen des Wiesbadener Thermalwassers.

Einfluß von Ferro- und Manganoionen auf Atmung und Gärung der Hefe.

Von

Karl Harpuder.

(Aus dem städtischen Forschungs-Institut für Bäderkunde und Stoffwechsel, Wiesbaden.)

(Eingegangen am 10. Januar 1927.)

In der vorhergehenden Mitteilung konnte gezeigt werden, daß das Wiesbadener Thermalwasser auf eine Anzahl biologischer Substrate unphysiologische Wirkungen ausübt. Um diese Sonderwirkungen der Quelle näher analysieren zu können, wird es zunächst nötig sein, festzustellen, ob sie durch einzelne bestimmte Salze, durch einen Synergismus mehrerer Bestandteile, oder durch das gesamte anorganische Milieu verursacht werden. Praktisch wollen wir so vorgehen, daß wir den Effekt einzelner Ionen auf die in der ersten Arbeit beobachteten oder ähnliche Vorgänge untersuchen und vergleichen mit den Einflüssen des Thermalwassers und einer künstlichen Lösung der Quellsalze, denen das betreffende Ion entzogen ist.

Da das zweiwertige Eisen- und Manganion im Hinblick auf seine katalytischen Eigenschaften auch physiologisch im Rahmen unserer Fragestellungen besonders interessierte, beschäftigt uns im folgenden die Wirkung des Ferro- und Manganoions, und zwar zunächst auf Atmung und Gärung von Hefe.

1. Einfluß von Ferro- und Manganosulfat auf die Atmung der Hefe.

Die Versuchsanordnung war ähnlich wie beim Thermalwasser. Als Ferro- und Manganosalz diente das kristallisierte Oxydulsulfat mit 7 H_2O. Sie wurden in wechselnder Konzentration in Ringer gelöst, deren Reaktion vorher an der Gaskette in erwünschtem Maße ins Saure verschoben worden war. Als Vergleichslösung diente Ringerlösung gleicher Reaktion ohne Schwermetallzusatz. Als Hefe wurde in den ersten Versuchen Bäckerhefe verwendet, die zweimal in der Zentrifuge mit Ringer gewaschen

war, später Bierhefe der Germaniabrauerei Wiesbaden, die in der Saugvorrichtung gründlich mit physiologischer NaCl-Lösung gewaschen wurde.

0,1 g der gereinigten Bäckerhefe wurde in 10 ccm Ringer suspendiert. Bei der Bierhefe mußte physiologische NaCl-Lösung genommen werden, weil sie in Ringer rasch und grobflockig sedimentierte, so daß das Abmessen schwierig gewesen wäre. 1 ccm der Suspensionen wurde im *Barcroft*-Manometer mit *Negelein*schen Gefäßen eingebracht, 9 ccm Ringer mit bzw. ohne Eisen- oder Mangansulfat zugesetzt, die 0,2 Proz. Dextrose enthielt, mit O_2 durchlüftet, dann unter Absorption der CO_2 mit Kalilauge, der O_2-Verbrauch bei 26° im Schüttelthermostaten gemessen. p_H der Lösungen schwankte um 4,3 und war in Vergleichsansätzen dasselbe. Die Konzentration der Schwermetallsalze ist aus den Tabellen ersichtlich.

a) Bäckerhefe.

Lösung	O_2-Verbrauch		Lösung	O_2-Verbrauch	
	cmm in 30′	cmm in 60′		cmm in 30′	cmm in 60′
Ringer-Ferro-sulfat m/250000	127,37	240,05	Ringer-Ferro-sulfat m/100000	79,51	142,20
Dasselbe	113,34	207,98	Dasselbe	94,34	176,88
Ringer	117,22	222,57	Ringer	93,45	168,20
„	123,35	232,60	„	91,45	166,57
Ringer-Ferro-sulfat m/50000	128,44	236,99	Ringer-Ferro-sulfat m/10000	108,55	196,42
Dasselbe	120,86	206,36	Dasselbe	107,60	208,31
Ringer	132,27	256,38	Ringer	127,37	253,12
„	142,62	273,54	„	132,52	256,42
Ringer-Ferro-sulfat m/1000 .	93,27	154,43	Ringer-Ferro-sulfat m/500 .	53,82	73,44
Dasselbe	92,86	141,45	Dasselbe	49,44	67,21
Ringer	171,60	273,54	Ringer	128,25	227,88
„	168,19	307,0	„	136,30	238,52

Aus der Tabelle geht hervor, daß Eisensulfat die Atmung der Bäckerhefe in reinem O_2 bei einer Konzentration von $1 \cdot 10^{-4}$ mol. zu beeinträchtigen beginnt. Niedrigere Konzentrationen sind wirkungslos, bei höheren nimmt die Schädigung der Oxydationsprozesse zu. Diese äußert sich nicht nur in dem geringeren O_2-Verbrauch, sondern auch in dem im Verhältnis zu reiner Ringerlösung schnelleren Abfall der Atmung im Laufe der Beobachtung, wie er schon in den zwei Halbstundenwerten der Tabelle zum Ausdruck kommt.

Mangansulfat übt dagegen in Konzentrationen von m/250000 bis m/1000 keinen sicher verwertbaren Einfluß auf die Atmung der Bäckerhefe aus. So war der O_2-Verbrauch bei m/250000 $MnSO_4$ in 30 Minuten für Ringer 125,74; 108,23 cmm; in 60 Minuten 246,58; 212,24 cmm; für die manganhaltige Lösung in den entsprechenden Zeiten 107,03; 114,90 bzw. 211,00; 232,82 cmm. Bei m/1000 $MnSO_4$ waren die Werte z. B. 78,38; 84,65 cmm O_2 in 30 Minuten; 155,14; 164,32 cmm O_2 in 60 Minuten

(Ringer) und 70,33; 76,65 cmm O_2 in 30 Minuten; 137,61; 150,35 cmm O_2 in 60 Minuten (Ringer-Mangan). Auf die ausführliche Wiedergabe der Protokolle kann daher verzichtet werden.

b) Bierhefe.

Lösung	O_2-Verbrauch cmm in 30′	O_2-Verbrauch cmm in 60′	Lösung	O_2-Verbrauch cmm in 30′	O_2-Verbrauch cmm in 60′
Ringer-Ferrosulfat m/100000	76,64	158,99	Ringer	102,44	180,42
Dasselbe	89,66	163,59	„	117,20	204,89
Ringer	84,92	173,09	Ringer-Ferrosulfat m/1000 .	39,75	65,75
„	68,30	136,00	Dasselbe	38,52	70,89
Ringer-Ferrosulfat m/10000	97,28	185,72	Ringer	42,56	80,02
Dasselbe	113,26	202,92	„	33,02	66,64

Die Bierhefe erweist sich also gegenüber dem Ferrosulfat in der Atmung resistent. Auch mit der relativ hohen Konzentration von m/1000 $Fe^{\cdot\cdot}$ konnte an drei verschiedenen Präparaten nie eine außerhalb der üblichen Schwankungen — die zum Teil wohl durch die kaum ganz exakt durchführbare Bemessung des Hefezusatzes bedingt sind — liegende Veränderung der Sauerstoffzehrung beobachtet werden. Auch mit Mangansulfat waren bei Bierhefe einwandfreie Veränderungen der Atmung nicht zu erzielen. Die Resultate der Parallelversuche zeigten trotz aller Mühewaltung wieder große Schwankungen, so daß erst aus einer erheblichen Zahl eine Übersicht zu gewinnen war.

Es ergab sich z. B. mit Ringer ein O_2-Verbrauch von 47,36 bzw. 44,92 cmm in 30 Minuten, 106,14 bzw. 94,14 cmm in 60 Minuten; mit m/100000 Mangan in Ringer gleichzeitig 38,23 bzw. 36,18 in 30 Minuten und 82,57 bzw. 78,65 cmm in 60 Minuten. Mit m/1000 Mangansulfat waren die Werte nach 30 Minuten 56,57 bzw. 43,15 bzw. 45,04 cmm O_2, nach 60 Minuten 107,03 bzw. 73,97 bzw. 76,50 cmm O_2, gleichzeitig wurden in Ringer 57,16 bzw. 57,96 in 30 Minuten, 117,58 bzw. 111,57 cmm O_2 in 60 Minuten verbraucht. In einem anderen Versuch standen den Ringerwerten 55,52 und 52,16 (30 Minuten), 117,58 und 102,88 (60 Minuten) bei m/1000 Mangan die Werte 45,87; 36,98 und 40,89 (30 Minuten) und 93,27; 83,21 und 86,45 (60 Minuten) gegenüber. So ähnlich noch in zwei weiteren Versuchen mit m/1000 Mangan. Man könnte zunächst geneigt sein, doch eine mäßige Beeinträchtigung der Atmung aus den Zahlen herauszulesen, doch scheint mir eine derartige Folgerung bei den verhältnismäßig großen Schwankungen nicht genügend begründet.

2. Einfluß von Ferro- und Manganosulfat auf die Gärung der Hefe.

Die allgemeine Anlage der Versuche entsprach auch hier den Bedingungen, wie sie in der vorausgehenden Arbeit bei der Hefegärung zur Anwendung kamen. Zunächst wurde Bäckerhefe, dann Bierhefe verwendet.

Die Hefen wurden wie für die Atmungsversuche gewaschen und 0,1 g in 10 ccm Ringer bzw. 0,9proz. NaCl-Lösung suspendiert. 0,2 ccm der Suspension wurden mit 0,8 ccm Ringer, die eventuell verschiedene Konzentration von Eisen- oder Mangansulfat enthielt, in *Barcroft*-Manometer mit *Negelein*-Gefäßen eingebracht. In die Birnen der Gefäße kam 1 ccm Ringer mit 20 Proz. Dextrose, gegebenenfalls gleichzeitig eines der beiden Schwermetallsalze enthaltend. Die Gefäße wurden mit CO_2 durchlüftet, in den Schüttelthermostaten gebracht und nach Eintritt des Temperaturausgleichs die Eigengärung beobachtet. Dann wurde die Zuckerlösung eingekippt und die CO_2-Produktion gemessen. Reaktion der Lösungen war um p_H 4,3.

a) Bäckerhefe.

Lösung	CO_2-Produktion		Lösung	CO_2-Produktion	
	cmm in 30′	cmm in 60′		cmm in 30′	cmm in 60′
Ringer-Ferrosulf. $1 . 10^{-6}$ mol.	65,64	155,35	Ringer	24,07	45,85
Dasselbe	69,13	167,77	„	26,26	51,57
Ringer	70,95	173,65	Ringer-Ferrosulf. $1 . 10^{-4}$ mol.	28,38	54,40
„	73,89	177,79	Dasselbe	36,94	73,88
Ringer-Ferrosulf. $2,5 . 10^{-6}$ mol.	24,69	41,57	Ringer	29,63	54,32
Dasselbe	23,09	41,56	„	24,07	48,85
Ringer	16,56	28,34	Ringer-Ferrosulf. $1 . 10^{-3}$ mol.	16,32	25,92
„	17,50	28,44	Dasselbe	18,45	28,66
Ringer-Ferrosulf. $1 . 10^{-5}$ mol.	51,03	99,33	Ringer	28,28	54,88
Dasselbe	54,40	108,80	„	32,54	65,66

Aus den Versuchszahlen geht hervor, daß Ferrosulfat bei einer Konzentration von m/1000 die Gärung der Bäckerhefe deutlich hemmt, bei Konzentrationen von m/100000 und m/250000 dagegen steigernd wirkt. m/1000000 Ferrosulfat ist wirkungslos.

Etwas anders verhält sich Mangansulfat. Es rief noch bei einer Verdünnung auf m/1000000 eine deutliche Stimulation der CO_2-Produktion hervor, die hinauf bis m/1000 anhielt. Auch m/100 $MnSO_4$ hemmte die Gärung nicht, es war scheinbar ohne Einfluß.

Lösung	CO_2-Produktion		Lösung	CO_2-Produktion	
	cmm in 30′	cmm in 60′		cmm in 30′	cmm in 60′
Ringer-$MnSO_4$ $1 . 10^{-6}$ mol.	79,01	140,85	Ringer-$MnSO_4$ $1 . 10^{-5}$ mol.	47,30	102,98
Dasselbe	76,58	139,03	Dasselbe	43,76	111,28
Ringer	62,34	110,83	Ringer	37,03	69,00
„	64,12	109,25	„	33,25	65,90
Ringer-$MnSO_4$ $1 . 10^{-3}$ mol.	85,43	177,79	Ringer-$MnSO_4$ $1 . 10^{-2}$ mol.	36,94	55,42
Dasselbe	72,20	146,60	Dasselbe	40,38	71,25
Ringer	56,79	118,39	Ringer	42,17	84,34
„	56,76	113,52	„	33,11	66,02

Mit Bierhefe wurden nicht unwesentlich andere Resultate erzielt. m/1000 $FeSO_4$ hemmte die Gärung, von m/10000 abwärts ließ sich ein sicherer Einfluß nicht mehr feststellen. Mangansulfat dagegen übte eine nennenswerte Wirkung auf die Gärung der Hefe überhaupt nicht aus.

b) Bierhefe.

Lösung	CO_2-Produktion cmm in 30′	CO_2-Produktion cmm in 60′	Lösung	CO_2-Produktion cmm in 30′	CO_2-Produktion cmm in 60′
Ringer-$FeSO_4$ $1 . 10^{-5}$ mol. . .	107,44	248,99	Ringer-$MnSO_4$ $1 . 10^{-5}$ mol. .	101,70	211,77
Dasselbe	114,00	248,50	Dasselbe	104,72	216,41
Ringer	118,51	256,65	Ringer	106,17	214,53
„	107,21	240,68	„	94,08	188,16
Ringer-$FeSO_4$ $1 . 10^{-4}$ mol. .	84,32	162,40	Ringer-$MnSO_4$ $1 . 10^{-4}$ mol. .	125,24	266,59
Dasselbe	69,88	125,42	Dasselbe	116,35	262,95
Ringer	87,52	166,82	Ringer	125,92	278,99
„	76,18	142,18	„	111,59	246,24
Ringer-$FeSO_4$ $1 . 10^{-3}$ mol. .	54,39	126,90	Ringer-$MnSO_4$ $1 . 10^{-3}$ mol . .	54,39	122,98
Dasselbe	53,52	112,99	Dasselbe	55,85	123,33
Ringer	86,42	177,52	Ringer	59,26	140,73
„	76,58	160,23	„	54,70	122,53

Zusammenfassend kann danach gesagt werden, daß Ferrosulfat in Konzentrationen von $1 . 10^{-4}$ mol. aufwärts die Atmung der Bäckerhefe beeinträchtigt, die Gärung bei einer Konzentration von $1 . 10^{-3}$ hemmt, bei solchen von $1 . 10^{-5}$ und niedriger erhöht, bis bei $1 . 10^{-6}$ jeder erkennbare Einfluß erlischt. Die Atmung der Bierhefe wird durch Eisensulfat nicht erkennbar verändert, ihre Gärkraft wird durch höhere Konzentrationen ($1 . 10^{-3}$ mol.) reduziert, bei niedrigeren bleibt sie unbeeinflußt.

Manganosulfat läßt die Atmung der Bäckerhefe unverändert, ihre Gärkraft ist bei Konzentrationen von $1 . 10^{-6}$ bis $1 . 10^{-3}$ mol. erhöht und wird durch eine solche von $1 . 10^{-2}$ noch nicht beeinträchtigt. Bei Bierhefe war weder Atmung noch Gärung gegen Mangan in Konzentrationen bis $1 . 10^{-3}$ empfindlich.

Radiometrische Mikroanalyse. III.

Von

Rudolf Ehrenberg.

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Göttingen.)

(Eingegangen am 11. Januar 1927.)

Inhalt.

Allgemeines.

Wie in den voraufgegangenen Mitteilungen[1]) dargelegt worden ist, beruht die radiometrische Mikroanalyse auf der elektrometrischen Messung des Aktivitätsverlustes oder -gewinnes einer mit dem radioaktiven Bleiisothop Thorium B infizierten Bleisalzlösung. Der Gang der Analyse auf ein zu bestimmendes Kation oder Anion wird so geleitet, daß er in eine Fällungs- oder Lösungsreaktion des Bleiions ausläuft, oder daß bei der Fällung eines Niederschlags das infizierte Blei in quantitativ vergleichbaren Mengen mitgerissen wird. Bei dem letztgenannten Verfahren darf die Konzentration des Bleiions nicht das Lösungsprodukt des betreffenden Bleisalzes erreichen, andererseits ist es nur in den Fällen anwendbar, wo — entsprechend neueren Untersuchungen von *Otto Hahn*[2]) — das betreffende schwer lösliche Bleisalz mit dem ausfallenden Niederschlag Mischkristalle bildet. Das gilt nach *Hahn* vom Fumarat, Chromat, Carbonat mehrerer Metalle, nach meinen Erfahrungen ferner vom Oxalat des Calciums. Diese Anionen, sowie manche mit ihnen fallende Kationen, sind daher mit diesem Verfahren bestimmbar, das den Vorteil hat, nur *einer* Fällungsreaktion zu bedürfen und große Aktivitätsunterschiede auf kleine Mengenunterschiede der untersuchten Substanz zu ergeben, den Nachteil, daß bei der niedrigen Konzentration an inaktivem Blei apparatuelle

---

[1]) Diese Zeitschr. **164**, 183, 1926; **172**, 10, 1926.
[2]) Ber. **59**, 2014.

Adsorptionsfehler störender werden können. Doch ist die Genauigkeit sehr gut, wenn man durch Parallelbestimmungen die Pipettierungsfehler ausschaltet, wie nachstehendes Beispiel einer Calciumbestimmung zeigt:

I. Je 0,25 ccm n/1000 $CaCl_2$ zu 1,0 H_2O + 1,0 ccm n/10^5 $Pb(NO_3)_2$ inf. + 1,0 ccm n/100 Ammoniumoxalat.

II. Je 0,5 ccm n/1000 $CaCl_2$ zu 1,0 H_2O + 1,0 ccm n/10^5 $Pb(NO_3)_2$ inf. + 1,0 ccm n/100 Ammoniumoxalat.

III. Je 0,75 ccm n/1000 $CaCl_2$ zu 1,0 H_2O + 1,0 ccm n/10^5 $Pb(NO_3)_2$ inf. + 1,0 ccm Ammoniumoxalat.

Zentrifugiert, je 2 ccm eingedampft. Aktivität = Teilstriche in 10 Sekunden.

Abfallelektrometer, 100 Teilstriche 200 Volt.

I.	II.	III.
5,56	4,58	3,22
5,42	4,45	3,18
5,56	4,25	3,17
5,43	4,22	3,15
5,40	4,30	—
5,53	4,27	—
5,48	4,34	3,18

Die Aktivitätsdifferenzen, entsprechend 0,005 mg Calcium, betragen in den beiden gleichen Intervallen also 114 bzw. 116, bis zu 0,00005 mg lassen sich also schon mit diesem wenig empfindlichen Elektrometer bestimmen.

Der Anwendungsbereich dieses Verfahrens ist durch die Fähigkeit zur Mischkristallbildung begrenzt, die Versuche, die adsorptive Mitnahme des Radioelements durch einen ausfallenden Niederschlag zur quantitativen Bestimmung zu verwerten, haben zu keinem brauchbaren Ergebnis geführt. Das ist verständlich, wenn — wie *Hahn* folgert — diese Adsorption von der Aufladung des Niederschlags abhängig ist; geringste Ungleichheiten der H-Ionenkonzentration wie auch andere in der Lösung vorhandene Ionen erwiesen sich als bedeutungsvoll, auch wird das Resultat durch den Kristallisationsvorgang selbst mitbedingt.

Als die allgemein anwendbare Methode wird daher die der Ausfällung des radioaktiv infizierten Bleies selbst, quantitativ abgestuft durch die voraufgehende eigentlich analytische Fällung, zu gelten haben.

I. Kationenbestimmung.

Prinzip: Eine definierte Lösung eines Salzes, dessen Anion sowohl mit dem zu bestimmenden Kation wie mit Blei ein schwer lösliches Salz bildet, fällt bei bestimmten Volumen zuerst das Bestimmungs-

kation, dann — nach Zentrifugieren — das infizierte Blei. Die zu bestimmende Konzentration des Kations kann unter der Fällungsgrenze bleiben und durch Hinzupipettieren eines Volumens der definierten Lösung eines seiner Salze darüber gebracht werden. Durch mehrfache Parallelbestimmungen wird der Pipettierungsfehler ausgeschaltet und mit diesem Verfahren der Anwendungsbereich auch auf minder schwerlösliche Salze ausgedehnt. Ein weiterer Vorteil ist, daß z. B. bei Untersuchung einer Asche deren Lösung für die anderen Ionen gleichzeitig so weit verdünnt wird, daß ihre Konzentration weder das Löslichkeitsprodukt mit dem zukommenden Anion noch mit dem Blei erreicht. Die Hinzufügung der Salzlösung stellt also anstatt einer Trennung auf die beabsichtigte Analyse ein und ermöglicht es, in ein und derselben Aschenlösung bei minimaler Ausgangsmenge nacheinander die verschiedenen Ionen zu bestimmen.

Beispiel.

I. 0,6 ccm n/1000 $CaCl_2$ + 0,1 ccm n/100 Ammoniumoxalat zu 1,0 ccm H_2O (zentrifugiert) + 1,0 ccm n/1000 $Pb(NO_3)_2$ (zentrifugiert), 1,0 ccm eingedampft.

II. 0,7 ccm n/1000 $CaCl_2$ + 0,1 ccm n/100 Ammoniumoxalat zu 1,0 ccm H_2O (zentrifugiert) + 1,0 ccm n/1000 $Pb(NO_3)_2$ (zentrifugiert), 1,0 ccm eingedampft.

III. 0,8 ccm n/1000 $CaCl_2$ + 0,1 ccm n/100 Ammoniumoxalat zu 1,0 ccm H_2O (zentrifugiert) + 1,0 ccm n/1000 $Pb(NO_3)_2$ (zentrifugiert), 1,0 ccm eingedampft.

Aktivitäten. 11,04, 12,59, 14,03 im Mittel. Differenzen für 0,002 mg Calcium 155 bzw. 144, Empfindlichkeit bis 0,00002 mg.

Will man die Empfindlichkeit steigern, so erhöht man die Abfallszeiten des Elektrometers durch größeren Abstand der strahlenden Substanz, oder Kapazitätssteigerung des Elektrometers, man kann so die Aktivität auf weitere Dezimalen errechnen. Voraussetzung ist ein hinreichend konstanter Elektrometerabfall auch bei schwächerer Ionisierung und eine genügende Zahl von Parallelbestimmungen.

Zu jeder Kationenbestimmung sucht man in Vorversuchen ein geeignetes Konzentrationsintervall aus, legt bei jeder Bestimmungsreihe die beiden Grenzkonzentrationen fest und wählt die Zusatzlösung so, daß sie bei dem konstanten Gesamtvolumen allein die untere Grenzkonzentration ergeben würde.

II. Anionenbestimmung.

Die einfachste Methode ist die direkte Fällung des infizierten Bleies mit dem fraglichen Anion, ihre Voraussetzung — Schwerlöslichkeit des betreffenden Bleisalzes — erfüllen von den biologisch wichtigen

Anionen Carbonat, Phosphat, Sulfat. Die Anwendung dieses Verfahrens ist in den früheren Mitteilungen erläutert worden. Ist — wie bei dem Chlorid — die Löslichkeit des Bleisalzes beträchtlich, so würde für das einfache Verfahren eine relativ hohe Bleikonzentration erforderlich sein, die radiometrisch gemessenen Unterschiede demgemäß sehr klein ausfallen. Hat man reichlich radioaktive Substanz und ein hochempfindliches Elektrometer zur Verfügung, so wird man auch so noch zu vielfach hinreichender Analysenempfindlichkeit kommen können, anderenfalls muß folgendes indirekte Verfahren eingeschlagen werden: Das fragliche Anion wird mit seiner analytischen Reaktion in definierter Überschußmenge des fällenden Kations gefällt, der nicht gefallene Anteil des Kations wird mit definiertem Überschuß eines Anions gefällt, welches auch ein schwerlösliches Bleisalz gibt, welch letzteres aus wiederum überschüssiger infizierter Lösung die Schlußfällung der Analyse bildet. Sämtliche Fällungen werden nacheinander in einem Zentrifugenglas mit enger Endkapillare vorgenommen, nach jeder Fällung zweckmäßigerweise zentrifugiert. So wird bei der Chloridbestimmung nacheinander mit Silbernitrat, Kaliumchromat und infiziertem Bleinitrat gefällt, Beispiel:

I. 0,05 ccm n/1000 $CaCl_2$ zu 0,15 ccm H_2O + 0,5 ccm n/1000 $AgNO_3$ (zentrifugiert) + 0,05 ccm n/100 K_2CrO_4 (zentrifugiert) + 1,0 ccm n/1000 $Pb(NO_3)_2$ inf. (zentrifugiert.

II. 0,10 ccm n/1000 $CaCl_2$ zu 0,15 ccm H_2O + 0,5 ccm n/1000 $AgNO_3$ (zentrifugiert) + 0,05 ccm n/100 K_2CrO_4 (zentrifugiert) + 1,0 ccm n/1000 $Pb(NO_3)_2$ inf. (zentrifugiert).

III. 0,15 ccm n/1000 $CaCl_2$ zu 0,15 ccm H_2O + 0,5 ccm n/1000 $AgNO_3$ (zentrifugiert) + 0,05 ccm n/100 K_2CrO_4 (zentrifugiert) + 1,0 ccm n/1000 $Pb(NO_3)_2$ inf. (zentrifugiert), je 1,0 ccm eingedampft.

I.	II.	III.
5 243	4 548	3,893
5,156	4,518	3,915
4 949	—	3,918
5,113	4,533	3,910

Differenzen für 0,0018 mg Cl 577 bzw. 623.

III. Acidimetrische Titration.

In der früheren Mitteilung wurde ein Verfahren beschrieben, das auf der teilweisen Wiederauflösung einer radioaktiv infizierten Bleicarbonatfällung durch die Säure beruhte. Neben diesem bewährte sich eine Modifikation, bei welcher der Carbonatniederschlag nach im Maßkölbchen erfolgtem Säure-Basenausgleich im Zentrifugengläschen erzeugt

wurde. Das Verfahren ist besonders dann vorzuziehen, wenn die Säure oder Base gasförmig in die Titrationsflüssigkeit gelangt, man benutzt dann — so bei der NH_3-Bestimmung — das Maßkölbchen als Vorlage und füllt es am Schluß nach Zusatz der Sodalösung auf, die Einzelheiten erhellen aus nachfolgendem Beispiel:

	10-ccm-Kölbchen.	Aktivitätsmittelwert.
I.	4 ccm n/1000 H_2SO_4 + 0,0 ccm n/1000 NH_3 + 1 ccm n/100 Soda	2,319
II.	4 „ n/1000 H_2SO_4 + 1,0 „ n/1000 NH_3 + 1 „ n/100 „	1,917
III.	4 „ n/1000 H_2SO_4 + 1,5 „ n/1000 NH_3 + 1 „ n/100 „	1,716
IV.	4 „ n/1000 H_2SO_4 + 1,75 „ n/1000 NH_3 + 1 „ n/100 „	1,617
V.	2 „ n/1000 H_2SO_4 + 0,0 „ n/1000 NH_3 + 1 „ n/100 „	1,501

Die Aktivitäten wurden bestimmt nach Zufügung von 1 ccm der Kölbchenlösungen zu 1 ccm n/1000 infizierter Bleinitratlösung, Zentrifugierung und Eindampfen von 1 ccm. In dem Versuch entspricht der Aktivitätsdifferenz von 100 je 0,0035 mg N_2.

Über eine entsprechend verkleinerte Mikrokjeldahleinrichtung sowie eine auf die radiometrische Titration gegründete Kohlenstoff-(Kohlensäure-) Bestimmung wird demnächst berichtet werden.

———————

Radiometrische Mikroanalyse.

IV. Mitteilung: Dispersitätsanalyse.

Von

Rudolf Ehrenberg.

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Göttingen.)

(Eingegangen am 11. Januar 1927.)

In einer früheren Mitteilung[1]) war gezeigt worden, daß kolloidal verteilte organische Substanz, wenn sie in geeigneter Weise verkohlt wird, ihren Verteilungszustand der entstehenden Kohle mitteilt, dergestalt, daß gröber verteilte Substanz eine porösere Kohle — gemessen an der Adsorptionsleistung gegenüber dem Methylenblau — ergibt. Dabei muß die großporigere Kohle gegenüber einer feinerporigen eine geringere Gesamtoberfläche haben. War also die Deutung der Methylenblauversuche auf die Struktur der Kohle richtig, so mußte bei Verwendung eines teilchenkleineren Adsorptivs umgekehrt die aus feiner verteilter Substanz entstandene Kohle die größere Adsorptionsleistung, entsprechend der größeren wirksamen Oberfläche, zeigen.

Es lag nahe, als solches teilchenkleineres Adsorptiv das radioaktiv infizierte Blei zu verwenden und als Maß der Adsorption die Abnahme der elektrometrisch bestimmten Aktivität in der mit der Kohle geschüttelten Lösung zu nehmen. Neben der Genauigkeit der Messung ergab sich damit die Möglichkeit, sehr kleine Kohlenmengen zu gebrauchen, womit die Methode für biologische Zwecke geeigneter wird; es wird — unter Verwendung der Mikrowage — mit Mengen von 1 bis 2 mg Kohle gearbeitet, was nicht die erforderliche Mindestmenge darstellt.

Methodik.

Die Verkohlung des organischen Materials wurde, wie in den Methylenblauversuchen, in einem Überschuß von Pottasche vorgenommen, in einigen noch nicht abgeschlossenen Versuchen auch

---

[1]) Diese Zeitschr. **161**, 339, 1926.

in anderen Salzen. Die anorganische Substanz hat der Annahme nach die Funktion, als Füllsel zwischen den organischen Teilchen zu dienen, deren Zusammentreten zu verhindern. Um diese Aufgabe zu erfüllen, muß sie eine hohe Wasserlöslichkeit haben, darf nicht beim Eintrocknen des Breies oder der gesättigten Lösung auskristallisieren, sondern muß wie Pottasche oder Calciumchlorid in kompakter Masse allmählich erstarren. Kristallisiert sie vorzeitig aus, so bestimmt ihre Kristallbildung, nicht die Verteilung des organischen Stoffes, die Oberflächenstruktur der Kohle, wie sich das bei Verkohlung in Kochsalz zeigte: die verschiedenen Ausgangsmaterialien ergaben alle Kohle von gleicher Adsorptionsleistung. Dieser negative Befund ist eine weitere Stütze für die dem Verfahren zugrunde liegende Annahme.

Als Modell diente 10proz. Gelatinelösung in Wasser, und zwar im Vergleich zwischen einer Lösung, die durch rasches Auflösen der trockenen Gelatine in heißem Wasser hergestellt war, und einer solchen, bei der die Gelatine vor dem Erwärmen eine Zeit in kaltem Wasser gequollen hatte. Es ist bekannt, daß in letzterem Falle die Gelatine feiner verteilt wird, es mußte daher, wenn die Annahme richtig war, aus ihr eine oberflächengrößere und gegenüber dem infizierten Bleinitrat adsorptionskräftigere Kohle entstehen. Das ist in der Tat der Fall. Zunächst wurde die „Kalt"-Gelatine — wie die gequollene im Unterschied von der „Heiß"-Gelatine kurz bezeichnet werden soll — 2 Stunden quellen gelassen. Der Adsorptionsversuch wurde durchweg mit 2 mg Kohlen auf 2 ccm n/1000 Bleinitrat angesetzt, ½ bis 1 Stunde im Schüttelapparat geschüttelt, zentrifugiert, 1 ccm eingedampft und mit der Ausgangsaktivität elektrometrisch verglichen. Die nachstehenden Werte sind jeweils Prozente der Ausgangsaktivität, die nach der Adsorption noch in der Lösung geblieben sind. Der vergleichsweise angesetzte Methylenblauversuch, gemäß der früher beschriebenen Methodik mit 25 mg auf 5 ccm m/100 Methylenblau, ergab, wie erwartet, eine stärkere Entfärbung durch die Heißgelatine, 10 Proz. gegenüber 7 Proz. durch die Kaltgelatine.

Prozentwerte der Aktivität von „Heiß" und (zweistündig) „Kalt".

Heiß:	44,0	57,0	64,0
Kalt:	38,8	35,4	54,0

Werte für „Heiß" und 24stündig gequollene „Kalt".

Heiß:	49,4	41,4	51,2	45,3	45,0	51,0
Kalt:	24,3	21,7	26,8	27,6	25,5	24,1

In einem Falle unter etwa 20 solcherart gewonnenen Gelatinekohlen ergab eine Kaltgelatine einen Wert der Größenordnung „Heiß", möglicherweise ein Versehen der Herstellung, niemals hatte ein „Heiß" die hohe Adsorptionsleistung von „Kalt". Die relativ gute Konstanz

der 24-Stunden-Kaltwerte läßt diese Kohle als ein geeignetes Testobjekt bei biologischen Dispersitätsvergleichsversuchen erscheinen.

Es ergibt sich die Frage, ob auch molekulardisperse organische Substanz ihren Verteilungszustand der solcherart gewonnenen Kohle mitteilt. Im Bejahungsfalle bietet sich die Aussicht, mit dieser Methode nicht nur die Teilchengröße, sondern vielleicht auch den Kohlenstoffgehalt kolloidal gelöster Teilchen zu ermitteln. Vorläufig ist zu sagen, daß in der Tat von molekulardisperser Ausgangssubstanz aus die adsorptionstüchtigsten Kohlen zu erhalten sind, so aus $^2/_3$ mol. Natriumoleinatlösung einen Aktivitätsrest von 12,8 Proz., aus m/2 Proz. Glycerin einen solchen von 7,6 Proz. Dabei ist noch zu bedenken, daß, je weiter die Adsorption geht, um so weniger für die noch verfügbare Oberfläche der Sättigungsteil der Adsorptionskurve gilt, die Aktivitätsabnahme, bezogen auf die Ausgangsaktivität und Oberflächeneinheit, immer geringer werden muß. Es sind Versuche im Gange, um diesen Zusammenhang weiter aufzuklären.

Für die biologischen Fragestellungen erschien es wichtig, die Methode auch auf die Erkennung des Verteilungszustandes von Gewebsbiokolloiden auszudehnen. Es wurde folgendermaßen verfahren:

Rasiermesserschnitte von Organen und Geweben wurden in Lösungen steigender Konzentration von Kaliumcarbonat — beginnend mit 1 Proz., endend bei Sättigung — eingetragen, in jeder Konzentration einige Zeit belassen und schließlich die von dem Salz inkrustierten und darin eingebetteten Schnitte verkohlt. Natürlich ist zu jeder Bestimmung eine Anzahl von Schnitten erforderlich, wenigstens wenn man nicht unter 1 mg Kohle im Adsorptionsversuch heruntergeht. Die nachfolgenden Werte sind mit 1 mg und 1 ccm n/1000 $Pb(NO_3)_2$ gewonnen, die Schnitte sind, wo nichts anderes bemerkt ist, unmittelbar nach Tötung des Tieres (Meerschweinchen) entnommen, in zwei Fällen nach sechsstündiger Autolyse bei 37° zum Vergleich mit dem lebensfrischen Organ. Das autolysierte Material ergibt, wie erwartet, entsprechend der verringerten Teilchengröße eine adsorptionskräftigere Kohle. Analog läßt sich die Methode zum Vergleich von Organen in verschiedenen Funktionszuständen, in der Mikrobiologie usw. verwenden.

Beispiele.

Leber	67,5	71,5	75,4 (51,8)
Niere.	45,7	49,8	72,3 (47,7)
Muskel	83,0		
Herzmuskel	81,5		

Die eingeklammerten Zahlen sind die zu den voranstehenden zugehörigen Autolysenwerte.

Natürlich ist so noch nicht erwiesen, daß der Dispersitätszustand in den Gewebsschnitten durch die Pottaschebehandlung ungeändert bleibt, immerhin spricht der Einfluß der Autolyse dafür, daß die Struktur im gleichen Sinne wie bei den kolloidalen Lösungen wirkt.

Weitere Versuche in dieser Richtung, zumal an Organen mit bekannten funktionellen Strukturveränderungen, werden weiterführen. Ebenso sind die Versuche fortzusetzen, die Pottasche bei der Verkohlung durch ein anderes Salz zu ersetzen. Daß das Kochsalz, wie oben erwähnt, unbrauchbar ist, weil es selbst die Struktur der Kohle bedingt und daher aus verschiedenen dispersen Materialien Kohlen von gleicher Adsorptionskraft erzeugt, zeigt folgendes Beispiel:

Leber	81	84	81	
Niere	89	81		
Heißgelatine	77	71	77	74
Kaltgelatine	77	79	77	
Rohrzucker	80	84	82	
Traubenzucker	74	74	77,5	

Die Werte für Zuckerkohlen aus Pottasche ändern sich mit der Konzentration der Zuckerlösungen, aus molarer Lösung z. B. 67, 70, aus m/10 51, 55, jedenfalls gegenüber den Gelatinekohlen und erst recht der Glycerinkohle viel zu hohe Werte. Bei leicht kristallisierenden Verkohlungssubstanzen scheint die Struktur der Kohle eine Funktion des Verhältnisses der Löslichkeit des organischen und des anorganischen Materials zu sein. Dem entspricht es, wenn mit Calciumchlorid als Füllsel Zuckerkohlenwerte gefunden werden, die unter denen für Gelatine liegen. Die Versuche mit Calciumchlorid sind noch nicht spruchreif, es macht sich hier die Austauschadsorption stark bemerkbar, die Kohlen müssen nicht nur gewässert, sondern auch mit mehrfach gewechselter konzentrierter Salzsäure behandelt werden, um übereinstimmende Werte zu ergeben. So gaben Gelatinekohlen ohne Salzsäurebehandlung 5,7, 8,6, 18,5, nach der Säure 65, 62, 63, 63; Rohrzucker vorher 4,9, nachher 32,5; Traubenzucker (frisch gelöst) 8,6 bzw. 43 in m/10 Lösung. Es ist anzunehmen und durch die Gelatineversuche bisher bestätigt, daß die gesättigte Calciumchloridlösung beim Eintrocknen den Verteilungszustand kolloidaler Lösungen verändert, sein Anwesungsbereich würden eher die molekulardispersen Stoffe sein, nach Fortführung der Versuche wird darüber berichtet werden.

Mastixsol und Proteine.

Von

Katsuo Hotta (Nagoya, Japan).

(Aus dem Institut für medizinische Kolloidchemie der Universität Wien.)

(Eingegangen am 12. Januar 1927.)

Das Mastixsol hat neben dem Goldsol sehr früh die Aufmerksamkeit der Mediziner wegen seiner Verwendbarkeit zu Kolloid-Eiweißflockungsreaktionen gefunden. Die letzteren haben wiederum wegen ihrer Beziehungen zu den Agglutinations- und Präzipitationserscheinungen, sowie besonders als Liquorreaktionen ein erhebliches praktisches Interesse erlangt. Gegenüber der günstigen Entwicklung der technischen Seite ist hier jedoch die theoretische Erkenntnis zurückgeblieben oder hat sich mit sehr unvollkommenen Bildern begnügen müssen, ein Umstand, der in erster Linie auf die ungenügende physikalisch-chemische Charakterisierung der verwendeten Sole und die unzureichende Berücksichtigung des Verhaltens und der Konstitution reinster elektrolytfreier Eiweißlösungen zurückgeführt werden muß. In dieser Richtung sollen die folgenden am Institute auf Anregung und unter Leitung des Herrn Prof. *Pauli* angestellten Beobachtungen im Verein mit anderweitigen[1]) Versuchen einen vorläufigen Beitrag liefern.

1. Physikalisch-chemische Charakteristik des Mastixsols.

Darstellung. Nach der üblichen Bereitung des Mastixsols wurde käuflicher Mastix im Verhältnis 1 : 10 in absolutem Alkohol gelöst. Von dieser Stammlösung wurden 2 ccm mit 20 ccm Alkohol verdünnt und dann tropfenweise unter Rühren zu 80 ccm destillierten Wassers gegossen. Später wurde die alkoholische Lösung auf einmal dem Wasser zugegeben und die Mischung einige Stunden geschüttelt.

Zur Reinigung des Mastix von Elektrolyten wurde die obige Stammlösung zur Hälfte mit Wasser verdünnt und wenigstens durch 48 Stunden in einem mittelgroßen *Pauli*schen Elektrodialysierapparat (220 Volt) unter zeitweiligem Umrühren durchströmt. Dabei wird der größte Teil des Harzes auf der anodischen Membran niedergeschlagen, von der er

[1]) Vgl. *M. Spiegel-Adolf*, diese Zeitschr. **180**, 395, 1927.



abgelöst und im Exsikkator getrocknet wurde. Dieses gereinigte und getrocknete Produkt diente zur neuerlichen Bereitung einer Stammlösung. Der verwendete Alkohol wurde durch Destillation gereinigt. Die Endkonzentration der Sole an Alkohol betrug 22 Vol.-Proz.

Methodik. Die H-Ionenaktivität (a_H) wurde potentiometrisch mit der rotierbaren *Pauli*schen Elektrode[1]) in einigen Fällen mit der *Biilmann*schen Chinhydronelektrode bestimmt. Ferner wurden die mittels der Mikroleitfähigkeitstitration [*Pauli-Semler*[2])] titrierbaren H-Ionen (c_H) ermittelt, die regelmäßig höhere Werte als a_H ergaben. Die Leitfähigkeitsmessung mußte wegen des erheblichen zeitlichen Anstieges mit unplatinierten Elektroden, also bei schlechterem Minimum, vorgenommen werden. Die Korrektur für die Leitfähigkeit des reinen Mediums wurde bei den Alkohol-Wassermischungen im Versuch jeweilig ermittelt, für die Wasserleitfähigkeit meist der erfahrungsmäßige Wert $2{,}5 \cdot 10^{-6}$ r. O. eingesetzt, soweit nicht besondere Umstände zu berücksichtigen waren.

Es war zunächst von Interesse festzustellen, ob ein reines Mastixsol ein Acidoid vorstellt, also ein Kolloid mit negativen aufladenden Komplexen und mit H^+ als Gegenionen. Diese Bezeichnung legt die rein chemische Auffassung als Säure zugrunde (*Pauli*) und ist nicht identisch mit der Nomenklatur von *L. Michaelis*[3]), der unter Acidoiden Sole mit dem isoelektrischen Punkt auf der sauren Seite des p_H versteht, unabhängig vom Reinheitsgrad und den vorhandenen Gegenionen. Der *Michaelis*sche Begriff Acidoid und Basoid deckt sich im wesentlichen mit der Bezeichnung elektronegatives und positives Kolloid und sieht z. B. nicht den Fall vor, daß es positive Sole mit OH als Gegenion praktisch nicht gibt[4]). Daß die aufladenden Komplexe der kolloiden Harze Harzsäureionen sind, die infolge der Verseifung im Wasser auf der Teilchenoberfläche entstehen, wurde zuerst von *Pauli*[5]) ausgesprochen. Die gleiche Auffassung des Ursprungs der Teilchenladung liegt wohl der Arbeit von *L. Michaelis* und *A. Domboviceanu*[6]) zugrunde, welche die Abhängigkeit der Wanderungsgeschwindigkeit des Mastixsols vom p_H der Flüssigkeit behandelt.

Um nun zu prüfen, ob das Mastixsol ein primäres reines Acidoid vorstellt, wurde, wie in früheren Arbeiten [*Pauli-Valko*[7])], aus der H-Aktivität und plausiblen Werten der Kolloidionenbeweglichkeit eine Leitfähigkeit errechnet, die mit der tatsächlich gemessenen verglichen wurde. Die Übereinstimmung der gefundenen und berechneten

---

[1]) Biochem. Zeitschr. **52**, 371, 1913 und Kolloid-Zeitschr. **21**, 51, 1917.

[2]) Kolloid-Zeitschr. **34**, 145, 1924.

[3]) Ebendaselbst **31**, 249, 1922.

[4]) Vgl. *Pauli*, Eiweißkörper und Kolloide. 2 Vorträge, J. Springer, Wien 1926.

[5]) Kolloid-Zeitschr. **28**, 50, 1921.

[6]) Ebendaselbst **34**, 322, 1924.

[7]) Zeitschr. f. physik. Chem. **121**, 161, 1926; daselbst Literatur.



Werte würde für den rein acidoiden Charakter des Sols sprechen und zugleich dafür, daß die weitere dieser Berechnungsweise zugrunde liegende Voraussetzung von der genügenden Übereinstimmung der Aktivitäts- und Leitfähigkeitskoeffizienten des Kolloids (in bezug auf das Gegenion) praktisch erfüllt war.

Die in unserem Falle vorliegende Komplikation besteht darin, daß das Mastixsol alkoholisch-wässerig war und daß in die Rechnung die Leitfähigkeit der Ionen in solchen Mischungen eingesetzt werden mußte. Zu ihrer Ermittlung wurde die Abhängigkeit der Äquivalentleitfähigkeit einer Schwefelsäure von bekannter Aktivität ($a_H = 3.99 \cdot 10^{-4}$ n) vom Alkoholgehalt des Lösungsmittels festgestellt. Im Meßbereich erwies sich das potentiometrisch bestimmte a_H als praktisch unabhängig vom wechselnden Alkoholgehalt. Die folgende Tabelle I zeigt die Abnahme der Leitfähigkeit mit der steigenden Alkoholkonzentration. Aus den gefundenen ($u_H + v_{SO_4}$)-Werten ergibt sich bei Annahme proportionaler Beeinflussung der Beweglichkeiten u_H und v_{SO_4} durch den Alkoholzusatz eine Tabelle für den Gang von u_H. Legt man für unser Mastixsol den Wert $v_{Koll} = 30$ zugrunde, so ermittelt sich $u + v = 236$ für den Alkoholgehalt von 22 Proz. Der gefundene Gang der Leitfähigkeit der Schwefelsäure stimmt befriedigend mit vorliegenden Werten von *Godlewski*[1]) überein.

Tabelle I.

Vol.-Proz. Alkohol	$k \cdot 10^4$ r. O.	$u + v$
0	1,709	428
4,25	1,473	378
9.5	1.381	345
13.75	1,228	308
19,00	1,09	273
20,9	—	259
23,25	0,904	238

In der Tabelle II ist ein Teil der ausgeführten potentiometrischen Messungen (a_H) und Leitfähigkeiten (k) an frischen Mastixsolen mit 22 Proz. Alkohol zusammengestellt. Unter *a* sind Sole mit einer Leitfähigkeitskorrektur von $1,2 \cdot 10^{-6}$ für die Alkoholwassermischung, unter *b* Sole aus einer anderen Stammlösung und etwas wechselnder Leitfähigkeit des Dispersionsmittels, die für jedes Sol separat bestimmt wurde, unter c) und d) sind Sole mit elektrodialytisch gereinigtem

[1]) Bull. Acad. Sc. Crac. 1904.

Mastix angeführt, wobei a_H in den letzten zwei Solen mittels der Chinhydronelektrode gemessen wurde.

Tabelle II.

Sol	$k \cdot 10^6$ r. O.	$a_H \cdot 10^5$	$a'_H \cdot 10^5$ berechnet aus k
		a)	
L	5,12	2,04	2,12
M	5,24	2,00	2,22
N	4,53	2,00	1,92
O	4,44	1,89	1,88
P	4,03	1,61	1,84
		b)	
S	5,03	1,85	2,12
T	3,74	1,49	1,58
U	3,51	1,24	1,49
V	3,03	1,06	1,28
W	4,70	1,81	1,99
Z	5,48	1,71	2,22
		c)	
IV	5,01	2,21	2,12
IX	10,04	4,08	4,25
X	6,42	2,64	2,72
XI	6,61	2,59	2,80
XIII	11,63	2,69	4,93
		d)	
XV	17,0	7,11	7,20
XVII	11,28	4,16	4,78

Die Versuche zeigen im allgemeinen eine befriedigende Übereinstimmung des gemessenen und des aus der Leitfähigkeit berechneten a'_H, wodurch der rein acidoide Charakter der in üblicher Weise hergestellten und ebenso der aus vorgereinigtem Mastix gewonnenen alkoholisch-wässerigen Sole in hohem Maße wahrscheinlich gemacht wird. In der Überzahl der Beobachtungen liegt der aus k berechnete a_H-Wert ein wenig aber merklich höher als der gemessene. Der Wert von a_H ist seiner Größenordnung nach dem Gehalt an Mastix (Trockengehalt etwa 0,4 bis 0,5 Proz.) und dem polydispersen Charakter des Sols entsprechend.

Die Mastixsole zeigen ferner eine starke *zeitliche Änderung*, erkennbar an einem Anstieg der Leitfähigkeit. Wie die Tabelle III dartut, entspricht diesem Anstieg ein nahe proportionales Anwachsen der H-Ionenkonzentration.

Tabelle III.

Sol	Zeit nach Herstellung	$k \cdot 10^6$ r. O.	$a_H \cdot 10^5$ beob.	$a_H \cdot 10^5$ aus k berechnet
4	sofort	11,26	—	—
4	8^d	15,27	7,55	6,47
5	sofort	8,26	—	—
5	8^d	20,1	8,84	8,48
XI	36^h	6,61	2,58	2,80
XI	4^d	9,93	4,69	4,21
B	1^d	7,04	2,12	2,98
B	8^d	9,41	3,55	3,99
F	1^d	8,6	2,59	3,56
F	6^d	9,9	4,16	4,20

Der zeitliche Anstieg der H-Ionenkonzentration kann zu verhältnismäßig hohen Werten derselben führen. Nach analogen Beobachtungen an Sulfidsolen müssen bei den gegebenen Solkonzentrationen die ansteigenden hohen Leitfähigkeiten und H-Aktivitäten auf die Ablösung der ionogenen Komplexe von den Solteilchen, also auf das Auftreten freier Harzsäure oder auf einen sehr feinteiligen Zerfall der Solpartikelchen bezogen werden. Daß ein Gleichgewicht mit in Lösung gegangener Harzsäure besteht, dafür könnte schon die meist merklich höhere a_H sprechen, die sich aus der Leitfähigkeit berechnet. Diese geringe Diskrepanz ließe sich beseitigen, wenn für die freie Harzsäure eine etwas höhere Beweglichkeit einzusetzen wäre als für das Kolloidion.

Man kann schließlich durch viele Stunden lange Vakuumdestillation bei 18 bis 25° C und ständigen Ersatz der wegdestillierten Flüssigkeit durch Wasser den Alkohol aus den Solen entfernen und so zu sehr stabilen, *rein wässerigen Mastixsolen* kommen. Auch diese zeigen den rein acidoiden Charakter und eine geringe, aber deutlich höhere Leitfähigkeit als dem gefundenen a_H entspricht (Tabelle IV). Behufs Ermittlung der Leitfähigkeitskorrektur wurde in diesen Versuchen Wasser in der gleichen Weise im Destillierapparat behandelt wie das Sol.

Tabelle IV.

Sol	$k \cdot 10^5$ r. O.	$a_H \cdot 10^5$	$a_H \cdot 10^5$ berechnet aus k
IV	1,92	3,85	4,94
V	1,45	3,42	3,81
VI	0,86	2,21	2,28

Aus den bisherigen Versuchen geht mit aller Wahrscheinlichkeit hervor, daß die *Mastixsole reine Acidoide sind* und *mit der Zeit eine Veränderung durch Ablösen der oberflächlichen, ionogenen Harzsäure erfahren, die sich als Anstieg von k und* a_H *kundgibt.* Sie stellen dann

nicht nur, wie nach der Herstellungsweise angenommen werden muß, polydisperse Sole, sondern geradezu *eine Mischung von Kolloidelektrolyt mit typischem Elektrolyt dar*. Diese Anschauung findet eine Bestätigung in einer nach Abschluß dieser Untersuchung erschienenen Arbeit von *H. V. Tartar* und *C. Z. Draves*[1]), welche in Solen, die 4 Wochen gestanden hatten, fast das ganze H durch dialysable bzw. ultrafiltrierbare Säure bedingt fanden, wie dies namentlich bei höheren Werten von a_H der stark verschiedenen Mastixsole erwartet werden darf.

2. Flockungsversuche mit Eiweißkörpern.

a) Glutin.

Für Gelatine hat *Menz*[2]) die bemerkenswerte, von *Zsigmondy* und *Joel*[3]) weitergeführte und analysierte Beobachtung gemacht, daß sie für das Formolgold ein von ihrem Dispersitätsgrad abhängiges Flockungsvermögen besitzt. Diese Flockung erschien nämlich nur auf die grobdisperse, trübe Zerteilung der französischen Gelatine beschränkt, welche man durch mehrtägiges Stehenlassen einer 1 proz. Lösung erhält und die nachträglich für die Flockungsprüfung verdünnt wird. Es findet sich dann in einem relativ engen Konzentrationsbereich dieser Gelatine mit Formolgold ein Farbenumschlag. Zum Unterschied von dieser grobdispersen Gelatine läßt sich eine sorgfältig nach Vordialyse bei 220 Volt elektrodialysierte Gelatine, entsprechend verdünnt, als nahezu klare Lösung gewinnen.

Die in unseren Versuchen verwendeten Mastixsole waren zunächst alkoholhaltige Typen (Tabelle V) von der Leitfähigkeit k und mittels der Leitfähigkeitstitration ermittelten H-Ionen c_H, welche fast das Doppelte der potentiometrisch bestimmten a_H betrugen. Der Mastix war stets vor der Verwendung zur Solbereitung durch Elektrodialyse gereinigt.

Tabelle V.

Sol:	M II	M III	M IV	M VI	M VII	M IX
$k \cdot 10^6$	8,89	6,3	16,6	8,95	4,73	1,35
$c_H \cdot 10^5$	2,5	2,4	5,6	3,00	2,25	2,25

Das Sol wurde zu gleichen Teilen mit der entsprechenden verdünnten Glutinlösung unter gründlicher Mischung versetzt. In sämtlichen Versuchen — von einer tabellarischen Wiedergabe wird hier abgesehen — fand sich in einem Bereich zwischen 0,45 bis 0,03 mg/ccm, etwas wechselnd bei den verschiedenen Solen, eine Flockungszone, deren Optimum etwa bei 0,25 mg/ccm lag. Niedrigere und höhere

[1]) Journ. phys. Chem. **30**, 763, 1926.
[2]) Zeitschr. f. physik. Chem. **66**, 129, 1909.
[3]) Ebendaselbst **113**, 302, 1924.

Glutingehalte blieben flockungsfrei. Die Flockung war weder durch Verdünnung noch durch nachträglichen Zusatz von überschüssigem Glutin reversibel. Sie war ferner bei französischer Gelatine und elektrodialysiertem Glutin für dasselbe Mastixsol und gleichen Glutingehalt nach Lage und Ausdehnung des Flockungsbereichs praktisch übereinstimmend.

Um den Einfluß des sauren Charakters der Mastixsole auszuschalten, wurden Versuche mit Zusatz von mittels KOH titriertem sowie übertitriertem Mastixsol (M IX) ausgeführt. Es zeigte sich, daß eine Zugabe von $5 \cdot 10^{-5}$ n bzw. $1 \cdot 10^{-4}$ n KOH (Endkonzentration) keine merkliche Verschiebung des Flockungsbereichs der zwischen 0,45 und 0,025 mg/ccm lag, bewirkte. Weiter wurde der Einfluß kleiner Mengen Neutralsalzes n/1000 KCl [Endkonzentration[1])] auf die Glutinflockung geprüft. Dabei ergab sich eine Verschiebung des gesamten Flockungsgebiets des Glutins in niedrigere Konzentration, und zwar von 0,2 bis 0,015 ohne Salzzusatz, in 0,05 bis 0,0025 mg/ccm mit dem angegebenen Salzzusatz (französische Gelatine und Sol M III). Ein analoges Verhalten war auch an elektrodialysierter Gelatine (Goldmarke) zu konstatieren.

Geringe Zusätze von Säure und Alkali zum Glutin vor Zugabe des Sols wirken im Sinne einer leichten Förderung bzw. Hemmung der Flockung. Doch läßt sich noch bei einem Verhältnis von 7 : 1 der 1 proz. Gelatine und von n/100 KOH eine merkliche Trübung des Mastixsols in der sonstigen Flockungszone erzielen. Erst eine weitere Verschiebung des Verhältnisses zugunsten der Lauge führt zu völliger Hemmung des Flockungsvermögens.

Es war nur noch zu prüfen, welche Rolle dem Alkoholgehalt des Mastixsols bei der Glutinflockung zukommt. Die Alkoholwirkung könnte vor allem darin bestehen, als Vorstufe der in hohen Alkoholkonzentrationen erfolgenden Fällung des Glutins, seinen Dispersitätsgrad zu verringern. Zur Entscheidung der Frage wurden Mastixsole einer wiederholten stundenlangen Vakuumdestillation in einem Apparat aus Jenaer Glas mit eingeschliffenen Verbindungsstücken unterworfen. Diese Temperatur betrug 18 bis 25°. Das ursprüngliche Flüssigkeitsvolumen wurde immer wieder durch destilliertes Wasser ersetzt. Die erzielten Sole erwiesen sich praktisch als alkoholfrei. Bei drei derartigen Mastixsolen zeigte sich, daß sie lediglich mit französischer Gelatine geflockt wurden, dagegen blieb die Flockung der die alkoholhaltigen Mastixsole koagulierenden elektrodialysierten Gelatine aus.

---

[1]) Das Salz wurde in n/10 Lösung dem Sol behutsam unter folgendem starken Schütteln zugesetzt, so daß von einer Volumenänderung des Sols abgesehen werden konnte.

Diese Flockung konnte jedoch schon in Anwesenheit von wenig Neutralsalz (Endkonzentration 0,002 n KCl) wieder hervorgerufen werden. Danach ist der Alkoholgehalt der gewöhnlichen Mastixsole von Bedeutung für die Flockbarkeit eines sonst zu fein dispersen Glutins.

b) Albumine.

Zur Verwendung kam ein reinstes Ovalbumin, das nach Vordialyse im Faltendialysator (bis zur Größenordnung von $k \sim 10^{-5}$) durch Elektrodialyse bei 220 Volt gereinigt und mittels wiederholten Zusatzes von n/100 K_2SO_4 globulinfrei gemacht worden war. Frisch elektrodialysiert, besaß es in 1proz. Lösung die Leitfähigkeit von $k = 9,2 \cdot 10^{-6}$, nach längerem Stehen $2,16 \cdot 10^{-5}$. Ein analog gereinigtes Seralbumin hatte beim Stehen an der Luft in 1,4proz. Lösung $k = 1,62 \cdot 10^{-5}$. Zugesetzt wurden die Mastixsole III, IV, VI (s. oben), die aus elektrodialysiertem Mastix bereitet waren.

Die gegenseitige Flockung von Mastixsolen und Serumeiweißkörpern ist lange bekannt und mannigfach verwendet. Sie dürfte zuerst von *O. Porges*[1]) angegeben worden sein. Für die Zwecke dieser Untersuchung war es lediglich von Interesse, das Verhalten hochgereinigter Eiweißkörper gegen Mastixsol festzustellen.

In den angestellten Versuchsserien fand sich bei Ovalbumin eine Flockung sofort bei 2 mg/ccm. Nach 12 Stunden Stehen der Mischung schon bei 0,1 mg/ccm. Auch das Seralbumin zeigte ein analoges Verhalten fast im gleichen Flockungsbereich. Eine *Hemmung oder Wiederauflösung der Flockungen im Eiweißüberschuß konnte nicht beobachtet werden.*

Von *Neutralsalzen* wurden KCl und K_2SO_4 in ihrem Einfluß auf die Flockung in der Weise untersucht, daß das Salz vorsichtig unter tropfenweisem Zusatz mit gleichmäßigem Rühren dem Sol bis zur Endkonzentration m/1000 zugefügt wurde. Es fand sich mit KCl eine geringe Förderung der Flockung, erkennbar an einem leichten Herabrücken der Eiweißkonzentration und an einer besseren Sichtbarkeit (Verdichtung) der Flocken. Bei K_2SO_4 war in der verwendeten Konzentration diese Wirkung weniger deutlich ausgesprochen.

Um das Verhalten von *Eiweißsalzen* zu prüfen, wurden Gemische von 1proz. Albuminlösungen mit 0,01 n Säure (bzw. Lauge) hergestellt und wechselnde Mengen davon den Mastixsolen (1 : 1) zugesetzt. Beim Säureeiweiß tritt eine scharfe, aber sehr eng begrenzte und deshalb leicht zu übersehende Flockungszone auf. Oberhalb und unterhalb dieser Flockungszone bleibt das Gemisch ungeändert. So fand sich für Ovalbumin und M VII eine Flockung zwischen 0,0125 und 0,0037 mg/ccm. (Diese Zahlen geben zugleich die vorhandene End-

[1]) Zentralbl. f. Bakt. 40, 133, 1905.



konzentration m/1000 HCl an.) Ähnliche Verhältnisse finden sich bei Seralbumin. Die Grenzwerte der Flockung liegen tief unter denen der reinen Albumine oder Säuren. Bei H_2SO_4 fand sich ein analoges Verhalten bei etwas geringerer Empfindlichkeit. So gab Ovalbumin $+ H_2SO_4$ einen Flockungsbereich von 0,087 bis 0,03 mg/ccm und Seralbumin $+ H_2SO_4$ einen solchen zwischen 0,075 bis 0,015 mg/ccm. *Mit Säureeiweiß tritt also im Überschuß des Eiweißsalzes Hemmung bzw. Wiederauflösung der Flockung auf.*

Laugenzusatz zum Eiweiß hemmt sein Flockungsvermögen, doch war dasselbe noch bei einem Verhältnis mg/ccm von 15 : 1 z. B. 1,41 mg Ovalbumin + 0,09 ccm n/1000 NaOH erhalten.

Die durch Vakuumdestillation erzielten *alkoholfreien Mastixsole* gaben mit den reinsten Albuminen *gleichfalls Flockungen*, und zwar ungefähr bei demselben Albumingehalt, wie die entsprechenden wässerig-alkoholischen Sole.

Zusammenfassung der Eiweißflockungsversuche.

1. Sowohl grobdisperse (nach *Menz-Zsigmondy* hergestellte), trübe, als auch elektrodialysierte, feindisperse, klare Glutinlösung gibt mit alkoholisch-wässerigen Mastixsolen in einem Bereich von 0,45 bis 0,03 mg Glutin pro 1 ccm eine Flockungszone. Diese Flockung ist weder bei Verdünnung, noch im Überschuß von Glutin reversibel.

2. Neutralsalzzusatz verschiebt diese Flockung in niedere Glutinkonzentrationen.

3. Dem Alkoholgehalt des Mastixsols kommt eine sensibilisierende Wirkung auf die Flockung feindispersen Glutins zu, ähnlich wie dem Neutralsalz.

4. Ersatz der H-Ionen des Mastixsols durch K-Ionen ist für die Glutinflockung irrelevant.

5. Säure oder Lauge, dem Glutin vor der Reaktion mit dem Sol zugesetzt, wirken mit zunehmender Konzentration zunächst fördernd bzw. hemmend auf die Solflockung.

6. Ovalbumin und Seralbumin geben eine Solflockung bei etwa 2 bis 0,1 mg/ccm. Dieselbe ist vom Alkoholgehalt des Mastixsols praktisch unbeeinflußt und wie beim Glutin weder auf Verdünnung noch im Albuminüberschuß reversibel.

7. Dagegen wird die Flockung mit Eiweißsalz (Säurealbumin) im Überschuß des Säureproteins wieder gelöst. Steigende Alkalizugabe zum Albumin hebt sein Flockungsvermögen allmählich auf.

Zur Frage nach dem Mineralstoffwechsel beim experimentell erzeugten Tetanus.

Von

J. M. Krinizki.

(Aus der chirurgischen Abteilung des Mečnikov-Krankenhauses in Leningrad.)

(Vorgetragen auf der 7. Sitzung der Endokrinologischen Gesellschaft am 22. Oktober 1926 in Leningrad.)

(Eingegangen am 12. Januar 1927.)

In allen sich im Organismus abspielenden Prozessen nimmt nicht nur irgend ein Organ oder ein Teil desselben, sondern ein ganzer Komplex von Organen teil. In diese Prozesse ist sowohl das zentrale und periphere Nervensystem und das vegetative Nervensystem als auch ein ganzes System von Zellen und Geweben mit verschiedenen Kombinationen der in ihnen enthaltenen Elektrolyten Ca, K und Na mit einbezogen. In neuerer Zeit beurteilt man die Tätigkeit aller Organe vom Standpunkt einer Veränderung des Flüssigkeitswechsels zwischen Zelle und Gewebe. Speziell den Elektrolyten Ca und Na wird in einer ganzen Reihe komplizierter physikalisch-chemischer Prozesse, die sich im Organismus abspielen (Osmose, Diffusion, Durchgängigkeit der Zellmembran), eine besondere Rolle zugeteilt.

Zondek und *Kraus* heben eine besondere antagonistische Wirkung von Ca und K hervor. Auf Grund ihrer experimentellen und klinischen Studien kommen erwähnte Autoren zu dem Schluß, daß die Elektrolyten von Ca und K auf Zellen und Gewebe auf dieselbe Weise einwirken, wie auch auf ein ganzes Organ. So ruft z. B. Ca die systolische Tätigkeit des Herzens, K umgekehrt die diastolische Tätigkeit hervor. Dementsprechend reagieren auch die Zellen auf Calciumwirkung mit systolischer, auf Kaliumeinwirkung mit diastolischer Tätigkeit. Diese Veränderungen hängen nach der Meinung von *Zondek* und *Kraus* augenscheinlich von dem Prozeß der Aufnahme und Abgabe flüssiger Substanzen von seiten der Zelle ab. Außerdem wird nach den Ergebnissen dieser Autoren und vieler anderer die Höhe des Calcium- und Kaliumstoffwechsels im Blute durch die Tätigkeit des vegetativen Nervensystems reguliert, sowohl von dessen sympathischem, als auch parasympathischem Teil. Unter normalen Verhältnissen strebt dieses

System zur Erhaltung des Calcium- und Kaliumgehalts auf beständiger Höhe. Bei einer Störung der regulierenden Tätigkeit dieses oder jenes Abschnitts des vegetativen Nervensystems tritt das Vorherrschen des einen der beiden Elektrolyten im Blute zutage. Die Autoren stellen somit zwei pathologische Formen des vegetativen Nervensystems fest. Die *erste* wird durch die Tonuserhöhung des sympathischen Nervensystems hervorgerufen, die *zweite* durch die Tonuserhöhung des parasympathischen Nervensystems. Dementsprechend wird dem Reizzustand des sympathischen Nervensystems die Bezeichnung *Sympathikotonie*, dem erhöhten Reizzustand des parasympathischen Systems aber die Bezeichnung *Vagotonie* gegeben. Die Sympathikotonie charakterisiert sich durch Störung des Mineralstoffwechsels im Blute, nämlich durch Verringerung des Calciumgehalts, einer gewissen Erhöhung des Kaliumgehalts, Abnahme des Phosphatgehalts, Vermehrung des Blutzuckers, Austritt von Zucker im Harn, ebenso aber durch Verringerung der Sekretion der Drüsenapparate.

Bei Erscheinungen der Vagatonie tritt eine Funktionshemmung des Vagusnerven auf; diese Erscheinung aber ist mit einer Verstärkung der autotischen Organtätigkeit und Abschwächung der Koordinationstätigkeit verbunden.

In bezug auf den Blutchemismus erhält man bei der Vagotonie gegenüber der Sympathikotonie umgekehrte Verhältnisse.

Es ist kaum anzuzweifeln, daß verschiedene pathologische Prozesse mit einer Störung des Mineralstoffwechsels einhergehen. *Biedl*, dann aber auch *Ibrahim* und *Falta* stellten auf Grund ihres Studiums des Blutchemismus einen genetischen Unterschied zwischen den Erkrankungen der Schilddrüse und der Nebenschilddrüsen fest. Die Untersuchungen von *Loeb* und vieler anderer stellten fest, daß die Erkrankung der Epithelkörperchen, welche mit einer Abschwächung ihrer Tätigkeit verbunden ist, sich klinisch durch Krämpfe äußert, vom Standpunkt des Mineralstoffwechsels aber sich durch Verringerung des Calciumgehalts und Veränderung des gegenseitigen Verhältnisses von Ca und K charakterisiert. *Tisdall*, *Cramer*, *Howland* bewiesen, daß bei Tetanie starke Hypokalzämie besteht.

Der Calciumgehalt fällt bis 5,5 mg-Proz. *Quest* fand in der Hirnsubstanz spasmophylischer Kinder einen erhöhten Gehalt an Kalksalzen. *Loeb* weist ferner darauf hin, daß Calciumionen eine hemmende Wirkung auf die Kontraktilitätsfunktion der Muskulatur ausüben und daß dank den Elektrolyten von Ca und K das Muskelsystem nicht beständigen rhythmischen Kontraktionen ausgesetzt ist. Wenn man bedenkt, daß zwischen der Funktion der Nebenschilddrüsen und dem Calciumstoffwechsel im Blute ein gewisser enger gegenseitiger Zusammenhang besteht, so erscheint die Tatsache des Auftretens tetanischer Krampfzustände mit einer Verringerung des Calciumgehalts im Blute nach Exstirpation der Nebenschilddrüsen verständlich, ebenso aber umgekehrt das Wiederverschwinden der Tetanie mit gleichzeitiger Calciumvermehrung im Blute nach Transplantation dieser Drüsen. Eine Störung des Calcium- und Kaliumgehalts im Blute konnte übrigens unter anderen Bedingungen, auf dem Wege der Einwirkung verschiedener pharmakologischer Gifte auf das sympathische oder parasympathische Nervensystem beobachtet werden. Unter diesen Giften sind Adrenalin, Cholin und Muscarin zu nennen.

Die Frage von der Störung des Mineralstoffwechsels bei der Vergiftung des tierischen Organismus durch bakterielle Gifte und speziell

durch Tetanotoxin erwies sich daher sehr interessant und untersuchungswürdig.

Auf Veranlassung von Prof. *V. A. Oppel* unternahm ich den Versuch zur Klärung der eben gestellten Frage. Es ist von vornherein zu bemerken, daß wir über die uns interessierende Frage aus der uns zugänglichen Literatur nur spärliche Ergebnisse schöpfen konnten.

Frank bestimmte den Blutzucker- und Glykogengehalt der Hirnsubstanz bei Tieren, denen er Tetanotoxin injizierte. *Kričevski* streift die Frage in seinem kritischen Artikel über „Endokrinologie in der Chirurgie" und erwähnt die Behandlung von Tetanus mittels Schilddrüsenextrakt. Der Autor hat von dieser Behandlungsmethode gute Resultate gesehen, die sich in Abschwächung der Krämpfe nach einigen Injektionen äußerten. *Kričevski* meint, daß die Abschwächung der Krämpfe der Einwirkung des Nebenschilddrüsenextrakts, welcher im Extrakt der Schilddrüse enthalten ist, zu verdanken ist. Je mehr Nebenschilddrüsenprodukte im Extrakt vorhanden sind, desto wirkungsvoller erweisen sie sich bei der Behandlung des Tetanus. Was nun das Studium des Calcium- und Kaliumstoffwechsels im Blut beim Tetanus und der Beziehung dieser Stoffe zur Funktionsstörung des vegetativen Nervensystems anbelangt, so konnten wir darüber in der uns zugänglichen Literatur keine Hinweise finden.

Eigene Untersuchungen.

Unsere Versuche teilten wir in zwei Gruppen. In der *ersten Versuchsreihe* riefen wir bei den Tieren Tetanus hervor und untersuchten nach Eintritt der klinischen Symptome das Blut auf Calcium- und Kaliumgehalt. In der zweiten Gruppe der Versuche transplantierten wir den Tieren ein Stück Menschenknochen, wodurch wir den Gehalt des Blutes an Calcium künstlich erhöhten, injizierten dann erst den Tieren Tetanotoxin und untersuchten die Veränderungen des Calcium- und Kaliumstoffwechsels. Das Tetanotoxin erhielten wir durch die freundliche Vermittlung von Prof. *B. P. Ebert*.

Das zu unseren Versuchen verwandte Tetanotoxin wurde im Laboratorium von Prof. *Ebert* vor einigen Jahren hergestellt, seine letale Dosis war uns unbekannt. An einer großen Anzahl von weißen Ratten und Mäusen und an mehreren Kaninchen stellten wir die letale Dosis ungefähr fest. Bei der Verdünnung 1 : 30000 traten keine Krämpfe ein, das Tier blieb am Leben. Bei einer Verdünnung von 1 : 20000 traten scharf ausgeprägte Tetanuserscheinungen am dritten Tage auf. Bei einem solchen Verdünnungsgrad begannen die Erscheinungen mit einer Kontraktur der hinteren Extremität und Kontraktur des Körpers zur Injektionseite hin. Am vierten Tage traten Kontraktur der übrigen Extremitäten und anhaltende Krämpfe auf. Der Tod trat am fünften oder sechsten Tage infolge Lähmung des Atmungs- und Herzzentrums ein.

Die Versuche der ersten Gruppe wurden an sechs Kaninchen von annähernd gleichem Gewicht und Alter ausgeführt. Im Laufe von 2 Wochen wurde bei diesen Tieren dreimal das Blut in bezug auf den Gehalt an Calcium und Kalium nach dem Verfahren von *de Waard* und

Cramer untersucht. Daraufhin wurde zwei Kaninchen, Nr. 1 und 2. Tetanotoxin in einer Lösung 1: 20000 subkutan injiziert. Den zwei anderen, Nr. 4 und 5, wurde das Gift in einer Verdünnung von 1 : 15000 und schließlich dem letzten Kaninchen, Nr. 6, in einer Verdünnung von 1 : 30000 injiziert; die Menge der injizierten Flüssigkeit betrug 1 g pro Kilogramm Gewicht. Nach der Injektion wurde das Blut systematisch alle 2 Tage und am Tage des Todes untersucht. Die Injektionen wurden subkutan an der einen oder der anderen Seite des Brustkorbs injiziert.

Die Ergebnisse der Veränderungen des Calcium- und Kaliumgehalts sind in folgender Tabelle niedergelegt.

Tabelle 1.

Versuch Nr.	Toxinmenge	Vor Einführung des Toxins					
		3. VI.		6. VI.		14. VI.	
		Ca	K	Ca	K	Ca	K
1	1 : 20 000	11,3	18,6	11,8	17,5	11,4	17,5
2	1 : 20 000	12,2	21,5	11,5	20,1	12,0	22,0
3	1 : 17 000	10,8	20,1	9,4	20,0	10,4	21,1
4	1 : 15 000	12,2	19,4	12,3	20,1	11,6	19,6
5	1 : 15 000	12,1	18,4	12,5	18,6	12,3	18,2
6	1 : 30 000	10,2	19,03	10,1	18,9	10,5	19,05

Versuch Nr.	Toxinmenge	Nach Einführung des Toxins					
		16. VI.		18. VI.		19. VI.	
		Ca	K	Ca	K	Ca	K
1	1 : 20 000	9,3	16,17	6,81	18,21	6,2	22.38
2	1 : 20 000	8,11	19,02	7,6	18,8	6,01	21,5
3	1 : 17 000	9,2	20,0	7,0	23,1	6,4	26.21
4	1 : 15 000	11,1	19,0	9,8	21,4	7,0	23,8
5	1 : 15 000	9,4	17,9	8,1	18,4	6,0	18,2
6	1 : 30 000	10,0	19,7	9,98	19,2	9,5	19,01

Ein Blick auf die angeführte Tabelle läßt uns folgende charakteristische Veränderungen des Blutchemismus nach Injektion einer tödlichen Dosis des Tetanotoxins erkennen. Am Versuch 6 sehen wir, daß beim Fehlen klinischer Krampfsymptome der Calcium- und Kaliumgehalt im Blute gar keine Veränderung zeigt. Nach Injektion einer letalen Dosis 1 : 20000 in den Versuchen 1 und 2 sehen wir eine starke Verminderung des Calciumgehalts, welcher sich von 11,3 bis 6,2 im Terminalstadium verringert, d. h. die Verminderung geht bis 50 Proz. Die Schwankungen des Kaliumgehalts gehen von 18,6 bis 20,5. Somit wird in diesen beiden Versuchen neben einer starken Hypokalzämie keine Veränderung des Kaliumgehalts beobachtet. In den beiden

anderen Versuchen, Nr. 3 und 4, bei der Toxindosis von 1 : 17000 und 1 : 15000, tritt wie in den vorhergehenden Versuchen eine starke Abnahme des Calciumgehalts im Mittel auf 50 bis 60 Proz. ein. Der Kaliumgehalt aber steigt z. B. von 20,1 bis 26,21, d. h. auf 20 Proz.; in den anderen Fällen sinkt der Calciumgehalt auf 50 Proz., der Kaliumgehalt aber schwankt zwischen normalen Grenzwerten. Zusammenfassend können wir aus den Ergebnissen der ersten Versuchsreihe folgende charakteristische Besonderheiten hervorheben: 1. Der Calciumgehalt im Blute fällt im Mittel auf 40 bis 50 Proz.; 2. je höher die Dosis des eingeführten Tetanotoxins ist, desto rascher und stärker sinkt die Calciummenge, so sank z. B. beim Kaninchen bei der Dosis von 1 : 20000 die Calciummenge am zweiten Tage nach der Injektion bis 9,0 mg Proz., bei dem anderen Kaninchen sank bei der Dosis von 1 : 15000 die Calciummenge in demselben Zeitabschnitt bis 7,0 mg-Proz.; 3. die Kaliummenge offenbarte in zwei Fällen eine unbedeutende Erhöhung auf 10 Proz. und nur in einem Falle auf 20 Proz. Das gegenseitige Verhältnis von Calcium und Kalium vermehrte sich in unseren Fällen immer zugunsten des Kaliums.

Der *zweite Teil der Arbeit* basiert sich auf sechs Versuche. In diesem Teile unserer Arbeit versuchten wir die Frage zu klären, inwiefern die künstliche Erhöhung des Calciumgehalts im Blute von dem Beginn und Verlauf der Tetanusinfektion abhängt. Uns auf die Ergebnisse von *Schmidt* und *Obraszov* stützend, transplantierten wir den Kaninchen Stückchen von Menschenknochen. Die Knochentransplantate wurden aus der Tibia entnommen, in Sodawasser 3 bis 4 Stunden lang ausgekocht und unter allen aseptischen Kautelen unter die Rückenhaut der Tiere transplantiert. Einige Tage später erwies sich das Transplantat mit dem umliegenden Gewebe fest verwachsen. Die Einheilung des Transplantats erfolgte gewöhnlich per primam intentionem. 10 bis 12 Tage nach vollständiger Einheilung des Transplantats wurde bei den Tieren, wie bei der ersten Versuchsgruppe, das Blut untersucht und dann tödliche Tetanotoxinmengen in der Verdünnung von 1 : 20000, 1 : 15000, 1 : 17000 und 1 : 30000 injiziert. Bei zwei Kaninchen wurde von Dr. *Galkin* die Blutzuckermenge nach *Hagedorn* untersucht. Die Ergebnisse dieser Versuchsgruppe sind in Tabelle II niedergelegt.

Tabelle II.

Gehalt an Blutzucker.

Versuch Nr.	Vor der Operation	Nach der Operation	Nach Einführung des Toxins
1	0,96	0,121	0,044
2	0,10	0,114	0,07

Tabelle III.

Versuch Nr.	Toxinmenge	Vor der Operation					
		20. VI.		25. VI.		30. VI.	
		Ca	K	Ca	K	Ca	K
1	1 : 20 000	11,2	21,1	11,9	20,9	11,7	21,6
2	1 : 20 000	11,9	18,4	12,4	17,8	12,0	18,0
3	1 : 15 000	10,4	22,3	11,2	22,6	10,1	21,5
4	1 : 15 000	12,1	20,5	12,3	20,1	11,7	21,3
5	1 : 17 000	10,1	22,5	10,6	22,0	10,2	22,6
6	1 : 30 000	12,1	19,5	11,9	19,0	12,4	19.6

Versuch Nr.	Toxinmenge	Nach der Transplantation					
		10. VII.		12. VII.		14. VII.	
		Ca	K	Ca	K	Ca	K
1	1 : 20 000	12,7	20,9	13,0	19,8	13.2	20,4
2	1 : 20 000	12,6	19,1	12,4	19,3	13,1	18,9
3	1 : 15 000	11,9	20,9	11,8	21,3	12,6	21,9
4	1 : 15 000	12,2	20,6	12,3	20,9	12.4	21.5
5	1 : 17 000	10,8	21,9	10,9	21,8	12,3	22,2
6	1 : 30 000	12,4	20,1	12,6	20,2	12.9	19.9

Versuch Nr.	Toxinmenge	Nach Einführung des Toxins					
		16. VII.		18. VII.		20. VII.	
		Ca	K	Ca	K	Ca	K
1	1 : 20 000	8,4	21,3	7,1	21,3	6.5	21,9
2	1 : 20 000	8,5	19,0	7,4	19,0	7,0	18,7
3	1 : 15 000	7,0	22,9	6,8	22,9	5,8	26,0
4	1 : 15 000	8,1	21,9	6,7	21,8	6.4	24,1
5	1 : 17 000	8,5	21,7	5,9	20,9	7,0	21,9
6	1 : 30 000	10.5	19.4	8,4	20,1	8,9	19,5

Wie aus dieser eben angeführten Tabelle zu ersehen ist, konnte bei allen Versuchstieren nach der Knochentransplantation eine Erhöhung des Calciumgehalts auf 10 bis 12 Proz. konstatiert werden. Der Kaliumgehalt behielt normale Grenzwerte. Nach Einführung des Toxins in der Verdünnung 1 : 20000 trat bei Kaninchen Nr. 1 und 2 eine starke Herabsetzung der Calciummenge ein, welche von 11,2 bis auf 6,5, d. h. auf 50 Proz. gefallen war. Der Wert des Kaliumgehalts schwankt zwischen 21,1 bis 21,9 mg-Proz. Nach Einführung einer stärkeren Dosis von Tetanotoxin (1 : 15000) können wir ebenso wie in den ersten Fällen, eine starke Herabsetzung des Calciumgehalts ungefähr auf 50 Proz. und eine entsprechende Vermehrung des Kaliumgehalts auf 20 Proz. vermerken. Nach Einführung einer nicht tödlichen Dosis, 1 : 30000, werden keine Veränderungen des Calcium- und Kaliumgehalts konstatiert. Zusammenfassend können wir von den Ergebnissen

der zweiten Versuchsreihe also folgendes sagen: 1. In allen Fällen stieg nach Knochentransplantation der Calciumgehalt des Blutes auf 8 bis 10 Proz., die Höhe des Kaliumgehalts blieb unverändert; 2. nach Einführung von Tetanotoxin wurde in allen Fällen eine starke Abnahme des Calciumgehalts vermerkt. In zwei Fällen wurde ein Steigen des Kaliumgehalts auf 10 bis 15 Proz. beobachtet; in allen anderen Fällen schwankt die Zahl des Kaliumgehalts zwischen normalen Grenzwerten.

Es stellt sich nun die Frage, wie man diese auf experimentellen Wegen erworbenen Tatsachen beurteilen und den komplizierten Fortgang der durch die Einführung des Tetanotoxins hervorgerufenen Reaktionserscheinungen vom Standpunkt des Blutchemismus und eines Zusammenhangs mit dem vegetativen Nervensystem erklären soll.

Wohlgemuth und einige andere Autoren nehmen an, daß die Verminderung des Calciumgehalts im Blute mit gleichzeitiger Vermehrung der Kaliummenge oder auch ohne diese Vermehrung die Äußerung eines besonderen Symptomenkomplexes ist, den sie als Sympathikotonie bezeichnen. *Wohlgemuth* glaubt dabei annehmen zu können, daß die Sympathikotonie — hervorgerufen in seinen Fällen durch die Ligatur des Ausführungsganges der Pankreasdrüse — auch von einer Erhöhung der gefäßverengernden Substanzen im Blut begleitet wird. Mit anderen Worten also glaubt *Wohlgemuth* annehmen zu können, daß die Sympathikotonie von Hyperadrenalinämie begleitet wird oder sogar dieser gleichgestellt werden kann, was durch die Dilatation der Froschpupille unter der Einwirkung des Blutserums seiner Versuchstiere bewiesen wird. Die Verminderung des Calciumgehalts und die Veränderung des Verhältnisses zwischen Calcium und Kalium stellt nach *Wohlgemuth* eine beständige Erscheinung dar.

Wie aus den Zahlenwerten unserer Tabelle zu ersehen ist, können wir in der Tat eine starke Verminderung des Calciumgehalts im Blute der Tiere, bei denen wir Tetanus hervorgerufen hatten, beobachten. Der Kaliumgehalt bleibt in der Mehrzahl der Fälle bei normalen Grenzwerten, nur in den wenigsten Fällen wird der Kaliumgehalt in der Tat etwas erhöht gefunden. *Wohlgemuth* meint übrigens, daß die absolute Erhöhung des Kaliumgehalts nicht wesentlich erscheint, eine viel größere Bedeutung besitzt die Veränderung des gegenseitigen Verhältnisses zwischen Kalium und Calcium, welches beim Zustande der Sympathikotonie zugunsten des Kaliums und zuungunsten des Calciums verändert wird. Auf diese Weise könnte es auf den ersten Blick scheinen, daß auch in unseren Fällen wir hinsichtlich der Störung des Kalium- und Calciumstoffwechsels das Bild einer Tonuserhöhung des sympathischen Nervensystems, d. h. Sympathikotonieerscheinungen, vor uns haben. Es fehlen aber die Ergebnisse, welche die erwähnten Aufstellungen zu unterstützen imstande sind. Wir müssen umgekehrt hervorheben, daß die Schwankungen des Kalium- und Calciumgehalts in dieser oder jener Richtung ganz isoliert und ohne gegenseitige Einwirkung vor sich gingen. Diese Behauptung wird dadurch bewiesen.

daß nach einer deutlichen Vermehrung des Calciumgehalts im Blute nach der Knochentransplantation die Höhe des Kaliumgehalts gar keine Änderung erfährt. Was nun die Schwankungen des Calcium- und Kaliumgehalts anbelangt, so kann man unter diesen, wie aus unseren Tabellen zu ersehen ist, keinen engen Zusammenhang feststellen. In den einen Fällen finden wir eine Erhöhung des Kaliumgehalts, in anderen erfährt derselbe keine Veränderung. Zweifelsohne muß man anerkennen, daß in einer Reihe von Fällen, besonders bei schweren pathologischen Prozessen, eine Erhöhung des Kaliumstoffwechsels bei Abnahme des Calciumgehalts eintritt. Doch hängt diese Erscheinung von vielen bis jetzt noch unaufgeklärten Bedingungen ab. Ebenso unaufgeklärt ist die Frage von der gegenseitigen Rückwirkung der Elektrolyten Ca und K.

In ihren weiteren Auseinandersetzungen kommen die Autoren, unter diesen auch *Wohlgemuth*, zu dem Schluß, daß die Schwankungen des Calcium- und Kaliumstoffwechsels immer von einer starken Erhöhung des Blutzuckergehalts begleitet werden. In den Versuchen von *Wohlgemuth* wies die Zuckermenge während einer langen Zeit hohe Zahlenwerte (0,16 bis 0,17) auf und erreichte schließlich die für leichte Diabetesformen charakteristischen Zahlenwerte. Die Untersuchungen von *Kylin, Abelin, Zondek* und *Kraus* stellten ebenso fest, daß die Verminderung des Calciumgehalts und die Vermehrung des Kaliumgehalts mit einer Erhöhung des Zuckergehalts einhergeht. Bei der Bestimmung des Blutzuckergehalts bei zweien unserer Versuchstiere fanden wir ein ganz umgekehrtes Verhältnis. Am Anfang der Tetanotoxinvergiftung, wo der Calcium- und Kaliumgehalt sich auf der normalen Höhe befand, beobachten wir eine geringe Hyperglykämie. Am Ende des Versuchs aber, zurzeit des stärksten Krämpfezustandes und dementsprechend zurzeit der höchsten Hypokalzämie und eines in einigen Fällen bedeutend erhöhten Calciumgehalts, erhielten wir eine Hypoglykämie. Dieser Umstand erscheint uns als selbstverständlich, da wir wissen, daß jede Muskelarbeit, in unseren Fällen aber persistierende Krämpfe, eine Verminderung des Blutzuckergehalts hervorrufen.

Die Ergebnisse der Blutzuckeruntersuchung bestärken uns noch mehr in der Auffassung, daß die Schwankungen des Calciumstoffwechsels, die Veränderungen des Kaliumgehalts und schließlich der Zuckergehalt des Blutes keineswegs parallel gehen. Jeder pathologische Prozeß kann von dieser oder jener Veränderung eines jeden einzelnen Symptomenkomplexes begleitet werden. Nach der Meinung von Prof. *V. A. Oppel* kann man schwerlich annehmen, daß die oben beschriebenen Veränderungen des Blutchemismus und ihr gegenseitiges Verhältnis als Äußerung einer besonderen Form eines pathologischen Zustandes

des vegetativen Nervensystems gelten können. Die Schwankungen des Calcium-, Kalium- und Zuckergehalts können nicht in strenger Gesetzmäßigkeit miteinander stehen, und die Veränderung des Gehalts eines jeden dieser Stoffe kann verschiedene pathologische Zustände des Organismus begleiten.

Wie dem auch sei, zeigen die Untersuchungen des Calcium- und Kaliumstoffwechsels bei experimentell erzeugtem Tetanus, daß, wie auch bei Tetaniekrämpfen mit hypofunktionierenden Nebenschilddrüsen, der Mineralstoffwechsel erheblich leidet. Die Auffassung, daß der Tonus des Muskelsystems und der Gleichgewichtszustand dieses Tonus sich in engem Zusammenhang mit der Gehaltshöhe der Calciumionen befindet, wird an unseren Versuchen vollkommen bestätigt.

Sehr interessant und beachtenswert erweist sich in unserer Zeit die Frage, inwiefern der Mineralstoffwechsel beim Tetanus in einem indirekten oder unmittelbaren Zusammenhang mit der Funktion der Nebenschilddrüsen steht, und ob hier nicht eine akute Minderwertigkeit der Nebenschilddrüsen vorliegt, die das ursächliche Moment zur Entstehung der Krampfzustände bildet. Die weiteren Untersuchungen sollen auf diesem Wege weitergeführt werden.

Zusammenfassend erlaube ich mir, folgende Schlußsätze aufzustellen:

1. Knochentransplantation (Heterotransplantation) ruft eine Vermehrung des Calciumgehalts im Blut hervor, wodurch die Untersuchungen von *Schmidt* und *Obraszov* bestätigt werden.

2. Schwache Dosen von Tetanotoxin üben auf die Mineralbestandteile des Blutes keinen Einfluß aus.

3. Starke, tödliche Tetanusgiftmengen verringern den Calciumgehalt im Blute bis zum Grade einer starken Hypokalzämie. Der Calciumgehalt ist gelegentlich besonders bei schweren klinischen Formen erhöht.

4. Der Symptomenkomplex des Tetanus enthält Hypokalzämie, relative Hyperkaliämie und terminale Hypoglykämie.

5 Durch die präventive Erhöhung des Calciumgehalts im Blute mittels Knochentransplantation kann weder der Entwicklung der Tetanussymptome vorgebeugt werden, noch der Beginn der Erkrankung angehalten werden.



Experimentelle Verschiebungen des Serumtryptasenwertes.

Von

O. Steppuhn und Xenia Utkin-Ljubowzow.

(Aus der Abteilung für experimentelle Pathologie und Pharmakologie des Staatlichen Chemo-Pharmazeutischen Forschungsinstituts, Moskau.)

(Eingegangen am 12. Januar 1927.)

Die Frage nach Herkunft und Qualität der Serumproteasen steht mit dem Problem der intracellulären proteolytischen Fermente in engster Verbindung. Sieht man von der möglichen Rückresorption der Verdauungstryptasen ab, so kann ja das Serum nur Zelltryptasen erhalten, sei es aus den Formelementen des Blutes, besonders Leucocyten oder aus den zu Geweben verbundenen Zellkomplexen. Es ist darum selbstverständlich, daß wir aus unseren Autolysestudien heraus auf die dunklen Punkte der Serumproteaseforschung stießen. Und je mehr wir uns in das Studium der Literatur und Bewertung unserer ersten Tastversuche vertieften, desto augenscheinlicher wurde es, daß die dunklen Punkte eigentlich dominieren.

Wenn eine ganze Reihe älterer Autoren dem nativen Serum keine proteolytische Fähigkeit zuschreiben konnten, so ist damit wohl nur die antitryptische Fähigkeit des Serums in bezug auch auf die Serumtryptasen bewiesen, denn in neuester Zeit ist es ja vielfach gelungen, auf verschiedene Weise die Serumproteasen zu „demaskieren“ — um nach *Jobling* zu sprechen — und eine Verdauung wie der eigenen, so auch zugeführter Proteine zu erzielen.

Glaubt *E. Abderhalden*, daß normales Serum keine Proteasen enthält, so ist das Wort „normales“ zu umschreiben. Sollten die beobachteten Proteasen durch Manipulationen an entsprechendem Blute also Defibrinieren und Zerfall von Leucocyten und Blutplättchen entstehen, so ist dieser Vorgang nur quantitativ durch die Manipulationen verstärkt. Im ganz normalen Organismus findet ein ständiger Untergang von Leucocyten statt; sollten deren Proteasen denn wirklich nicht vom Blute mitgenommen werden können? Ebenso verständlich erscheint es, daß Organ- und Gewebsproteasen in den Blutstrom gelangen müssen.

Neuerdings haben ja auch wieder *M. Schierge*[1]) und *Hans J. Fuchs*[2]) interessante Ergebnisse über proteolytische Fermente des Serums publiziert;

---

[1]) *M. Schirge*, Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **32**, **34**, **1923**.
[2]) *H. Fuchs*, diese Zeitschr. **170**, 76, 1926; **176**, 92, 1926.

die angewandten Methoden sind verschieden und die fermentative Fähigkeit vollkommen deutlich meßbar. Inzwischen ist auch eine Arbeit aus unserem Institut von *L.* und *Xenia Utkin Ljubowzow*[1]) erschienen mit der Beschreibung einer besonderen Versuchsanordnung, welche die systoproteolytische Fähigkeit des Serums hemmt und die Proteolyse an der Caseinverdauung mißt — bis zu 70 Proz. des zugesetzten Substrats wurden vom Meerschweinchenserum verdaut. Es erscheint uns somit, daß *C. Oppenheimer*[2]) wohl nicht recht hat, wenn er an einer Stelle schreibt: daß Serum, praktisch genommen, kaum Proteasen führt. Es führt eben wohl kaum *manifeste* Proteasen und auch diese mit Einschränkung, denn in saurer Pufferung autolysiert ja auch Serum, und diese Ausdrucksweise ist sicher mehr berechtigt, wie die immer bereite Erklärungsformel — in saurer Pufferung wird das Antitrypsin „zerstört".

Diese systo- oder antiproteolytische Fähigkeit des Serums, welche sicher eine große biologische Bedeutung besitzt, weil eben im Serum meist unspezifische, polylytische Proteasen kreisen, die die Serumproteine angreifen könnten, hat die Serumproteaseforschung aufgehalten, und wenn später durch „Beseitigung" des Antitrypsins mittels Chloroform, Aceton, Phenolderivaten, Kieselgur, Kohle, Kaolin usw. eine noch deutliche Serumautolyse eingeleitet werden konnte, so war einmal die Verdauung gering, andererseits aber ist es kein glücklicher Gedanke, wenn man nicht die Autolyse als solche studiert, sondern die Proteolyse überhaupt *messen* will, diese an einer Selbstverdauung zu messen. Es ist selbstverständlich, daß verschiedene Serien besonders bei pathologischen Erscheinungen *auch* ein verändertes Substrat aufweisen; für das Gesamtresultat ist also nicht nur Fermentaktivität, sondern auch die Qualität des Substrats ausschlaggebend.

Bevor die erwähnte Methode[3]) bei uns ausgearbeitet wurde, haben wir versucht, die Serumautolyse nach Behandlung mit Chloroform, Kaolin usw. in Pufferlösungen zu messen, und können nicht über gute Erfahrungen reden.

Das Wirkungsoptimum ist wohl das erste, was ein Ferment charakterisiert. Will man die Frage der Herkunft und Qualität proteolytischer Serumfermente entscheiden, so ist vor allen Dingen nachzusehen, welche Wasserstoffionenkonzentrationen als Wirkungsoptima bestimmt werden können und welche Übereinstimmung die so gefundenen Werte mit denen von Fermenten erwarteter Herkunft zeigen. Die folgende Mitteilung behandelt diese Frage.

Gleichzeitig begannen wir aber mit der Untersuchung der Serumtryptasen bei gepufferter, neutraler Reaktion, um vor allen Dingen sich zu vergewissern, ob eine Konstanz der Tryptasewerte bei einzelnen

[1]) *L.* und *Xenia Utkin-Ljubowzow*, diese Zeitschr. **169**, 100, 1926.
[2]) *C. Oppenheimer*, Fermente S. 1070, 2620.
[3]) l. c.



Individuen und gleichartigen Tieren überhaupt besteht, und sodann Verschiebungen der Tryptasewerte zu fassen, die auftreten müßten, wenn der problematische Tryptaselieferant des Serums entweder im Organismus ausgeschaltet oder umgekehrt dessen erhöhte Tätigkeit provoziert wurde. Gerade diese Fragestellung verlangte ein leicht und von allen Tryptasen angreifbares Substrat; als solches war das Casein sehr gelegen. Wie gesagt, arbeiteten wir bei $p_H = 7$ im optimalen Tryptasebereich[1]), um einer jeden eventuell auftretenden Tryptase gerecht zu werden. Wir hielten uns in allen Einzelheiten an die Methode von *L.* und *Xenia Utkin-Ljubowzow* (l. c.). Mit dieser Methode arbeitend, stellten wir die ersten Versuche so an, daß wir auch die Verdauung im optimalen Bereich der Organpepsinasen (p_H = etwa 3,5) bestimmten. Es war entweder gar keine oder minimale Verdauung zu messen; dieses veranlaßte uns, davon Abstand zu nehmen und sich mit dem $p_H = 7$ zu begnügen. Es ist aber schon daraus ersichtlich, daß Organ und Gewebsproteasen nur einen sehr geringen Teil der Serumproteasen ausmachen, denn alle Organe enthalten Pepsinasen, und würden die intracellulären Proteasen in großen Mengen aus den Zellen herausgeschwemmt, so müßten neben den Zelltryptasen auch die Zellpepsinasen im Blute kreisen, dieses ist aber nicht der Fall. In einer anderen Arbeit (gemeinsam mit *O. Ssokolnikow*) werden wir Gelegenheit finden, darüber mitzuteilen, ob bedeutend mehr Pepsinasen im Blute bei in-vivo-Autolysen (Cancer, gelbe Leberatrophie, eventuell Tuberkulose) und bei künstlich gesteigertem Pepsinasegehalt der Gewebe [Schilddrüsenfütterung[2])] auftreten.

Die vorliegende Arbeit behandelt nur die Veränderung der Tryptasenwerte im Serum nach Milzexstirpation, nach Provozierung eines sterilen Abszesses durch Terpentininjektion nach Pankreasexstirpation und besonders nach Injektion von artfremdem Eiweiß. Diese Wahl der Versuche schien uns insofern gegeben, als eine Entscheidung über Herkunft der Serumproteasen getroffen werden konnte. Sollten die Serumproteasen *auch* von den Leucocyten herstammen, so mußte die Milzexstirpation zu einem Sturz der Serumtryptasen führen, ein steriler Abszeß dagegen zu ihrer Anreicherung im Serum.

Sollte rückresorbiertes Trypsin für den Serumtryptasewert in Betracht kommen, so müßte nach Pankreasexstirpation das Serum an Tryptase verarmen. Schließlich war es auch interessant, nachzusehen, wie sich die Aktivität der Serumtryptasen nach Einführung blutfremder Proteine verändert; auf diesbezügliche Einzelheiten der Versuchsanordnung werden wir weiter zurückkommen.

---

[1]) *Okubo* fand für Serum die optimale p_H mit 7,0. Ber. phys. **27**, 195; **28**, 467.

[2]) Siehe diese Zeitschr. **175**, 476, 1926.



Schon als Kontrolle aller dieser Versuche mußten vor allen Dingen die Tagesschwankungen der Tryptasewerte und Mittelzahlen bei verschiedenen Individuen festgestellt werden. Unsere Arbeit ist mit einer Ausnahme an Kaninchen und Hunden ausgeführt — also interessierten uns vor allen Dingen diese Tiere. Ergänzend untersuchten wir aber auch eine Reihe von Meerschweinchen. Bei den meisten Tiernummern ist auch Fluoridplasma untersucht worden, nachdem wir uns vergewissern konnten, daß NaF in diesen Konzentrationen die Fermenttätigkeit nicht unterdrückt. Diesbezügliche Tabellen seien im folgenden mitgeteilt.

Aus den angeführten Tabellen ersieht man vor allen Dingen, daß beim Kaninchen und Hund die Tagesschwankungen nicht sehr bedeutend sind, bei Meerschweinchen kommen gänzlich aus der Reihe fallende Zahlen vor, davon haben wir uns seitdem bei anderen Fragestellungen öfters überzeugen können. Vergleicht man die Mittelzahlen bei den Kaninchen und Hunden, so sind die individuellen Schwankungen auch nicht allzu groß und ist die größte beobachtete Differenz zwischen dem größten und kleinsten Wert etwa 40 Proz.

Diese Orientierung genügte uns, um nicht weniger als aus drei inhaltlich übereinstimmenden Versuchen irgendwelche Schlüsse ziehen zu dürfen.

Es ist interessant, hervorzuheben, daß *Plasma* mit ganz wenigen Ausnahmen einen geringeren Wert gab als das Serum, man braucht nur die angegebenen Mittelzahlen zu betrachten. Diese Erscheinung könnten wir nur so deuten, daß bei dem Gerinnungsprozeß durch Untergang von Leucocyten und Blutplättchen das Serum an Tryptasen angereichert wird, andererseits findet sicher eine Adsorption von Tryptasen an Fibrin statt; der Serumwert ist dann eben ein Mittelwert aus diesen gegeneinander arbeitenden Mechanismen. Aber nicht nur dieses ist ausschlaggebend; wir haben des öfteren beobachtet (die entsprechenden Zahlen führen wir in den Tabellen nicht an, weil sie keine direkte Beziehung zu unserer Fragestellung haben), daß, wenn Plasma die Nacht über gestanden hatte und eine Nachgerinnung stattgefunden, das nun erhaltene Serum wieder viel aktiver war als das Plasma; in diesem Falle konnte ja aber nur von einer Adsorption an das Gerinnsel, also Verarmung an Tryptase gesprochen werden; somit spielen physikalisch-chemische Zustandsfragen hier wohl eine bedeutende Rolle. Dieses zwang uns zu der Entscheidung, doch mit Serum zu arbeiten, welches wenigstens den Vorzug gleichmäßiger Werte hat.

Pankreasexstirpation. Wie bereits mitgeteilt, haben wir durch Pankreasexstirpation feststellen wollen, ob Blut namhafte Mengen von Pankreastryptase enthält. Die Operation durfte natürlich nicht zu Diabetes führen, da dabei Veränderungen auftreten, die sicher im Proteasehaushalt der Organe eine bedeutsame Rolle spielen. Die Zuckernachfrage im an Zucker verarmenden Organismus zwingt zum Nachschub aus Proteinkomponenten, was so oder anders die Proteasentätigkeit der Zellen anfacht; Widerspiegelungen davon könnten im Blute nachzuweisen sein. Es wurde somit darauf acht gegeben, daß

Tabelle I.

Kaninchen Nr. 1			Kaninchen Nr. 2			Kaninchen Nr. 3			Kaninchen Nr. 4			Kaninchen Nr. 5		
Serum	Plasma	Datum	Serum	Plasma	Datum	Serum	Plasma	Datum	Serum	Plasma	Datum	Serum	Plasma	Datum
29,8	—	26. III.	25,2	11,5	22. V.	33,8	15,8	15. VI.	22,8	20,2	2. X.	21,0	15,6	10. X.
22,3	—	6. IV.	33,6	20,6	29. V.	31,3	17,5	17. VI.	17,1	27,2	7. X.	25,5	—	16. X.
26,1	—	15. IV.	25,5	27,2	1. VI.	35,8	19,6	22. VI.				16,6	9,2	20. X.
30,2	—	5. V.	27,9	18,3	9. VI.									
27,1	—		28,1	19,4		33,3	17,6		20,0	23,7		21,0	12,4	

Meerschweinchen Nr. 1			Meerschweinchen Nr. 2			Meerschweinchen Nr. 3			Hund Nr. 1		Hund Nr. 2	
Serum	Plasma	Datum	Serum	Plasma	Datum	Serum	Plasma	Datum	Serum	Datum	Serum	Datum
25,5	6,3	19. VIII.	42,8	19,9	1. IX.	8,4	9,3	3. IX.	16,0	15. X.	22,0	29. XII.
		26. VIII.	29,3	14,2	7. IX.	23,9	16,4	11. IX.	20,5	17. X.	19,8	30. XII.
			71,3		29. IX.							
25,5	6,3		47,8	17,1		16,2	12,9		18,2		20,9	

bei der Operation ein geringer Teil des Insularapparats erhalten blieb; es trat auch nie Zucker im Harn auf. Die Operationen (an Hunden) wurden unter leichter Pantopon-Chloroformnarkose bei Beachtung strengster Asepsis ausgeführt. Die Bestimmung der Tryptasen im Serum geschah kurz vor der Operation und dann nach der Operation in bestimmten Zeitintervallen.

Wie bekannt, vertritt *Boldyreff* hauptsächlich die Meinung, daß Organtryptasen von den Pankreastryptasen herstammen, insbesondere will er ja das Auftreten der *Abderhalden*schen Abwehrfermente auf dem Wege einer Rückresorption aus dem Darmtraktus erklären. Von diesem Standpunkt aus wäre es zu erwarten, daß nach Pankreasexstirpation eine Verarmung des Blutes an Tryptasen eintreten würde. Wir wollen hier in keiner Weise zu der *Boldyreff*schen Theorie im einzelnen oder allgemeinen Stellung nehmen; unsere Aufgabe sollte nur sein, festzustellen, ob im normalen Serum die rückresorbierten Proteasen einen Anteil haben, und dieses scheint uns nach unseren Versuchen zweifelhaft. Unsere Resultate sind in Tabelle II zusammengestellt. Der prozentuale Caseinzerfall ist der Kürze halber mit „C. Z." bezeichnet.

Die Versuche sind nur an Hunden ausgeführt, da die Pankreasexstirpation bei Kaninchen große Schwierigkeiten bereitet; es ist das Organ im Netz in Form kleiner Inseln zerstreut.

Tabelle II.

Nr.	C. Z. vor der Operation	Tage nach der Operation	C. Z. nach der Operation
1	20,5	2	23,1
2	14,0	3	16,1
3	14,5	5	27,4
4	17,3	9	31,7

Wie die Tabelle II zeigt, ist in keinem Falle eine Verarmung des Serums an Tryptasen zu bemerken, und das ist für uns die Hauptsache. Weshalb in allen Fällen eine größere oder geringere *Anreicherung* des Blutes an Tryptasen stattfindet, ist eine interessante, aber für unsere direkte Aufgabe eine nebensächliche Frage. Wir haben Ursache anzunehmen, daß nach der Operation unaufgespaltene Proteinanteile ins Blut gelangen und als solche zu den Organen transportiert werden. Mag sein, daß dort, wo ein Organ im gegebenen Augenblick Eiweißbruchstücke, also im physiologischen Zustande Aminosäuren braucht, die höheren Komplexe nicht bewältigt werden können und Tryptasen von anderen Organen vikarierend herbeigeschafft werden, was ja natürlich auf dem Wege der Blutbahn geschieht. Jedenfalls haben wir bei anderen Versuchen, über die wir berichten werden, gleichzeitig mit

dem Anwachsen der Serumtryptasen eine Verarmung in einzelnen Organen gesehen.

Aus dem oben Dargelegten schließen wir, daß rückresorbierte Pankreastryptasen keinen merklichen Anteil der Serumtryptasen darstellen.

Steriler Abszeß. Um zu prüfen, inwieweit Leucocytose, Ansammlung von Leucocyten an einer Stelle und deren Untergang für die Serumtryptasen verantwortlich sind, erzeugten wir durch Terpentininjektion ins Peritoneum beim Kaninchen einen sterilen Abszeß und untersuchten das Blut auf Tryptasen vor der Operation und in zwei Zeitintervallen danach.

Es war vorher aber noch festzustellen, wie Terpentinöl, welches auf dem Wege der parenteralen Einführung natürlich auch in das Blut gelangen mußte, die Tryptasen beeinflußt. Es stellte sich heraus, daß Terpentinöl die Serumtryptase in unserer Versuchsanordnung merklich hemmt. Zusatz von 0,02 ccm Terpentinöl zu 1 ccm Serum drückt den Tryptasenwert auf etwa 20 bis 25 Proz. herab. Die Leucocytenansammlung wurde von uns durch Injektion von 0,5 ccm Terpentinöl provoziert; somit war im Blute die Konzentration von Terpentin sicher geringer. Immerhin mußte man damit rechnen, daß die Werte nach Injektion im Hauptversuch größer zu veranschlagen sind, als die tatsächlich gefundenen. Die Tabelle III illustriert den eigentlichen Versuch.

Tabelle III.

Kaninchen Nr.	C. Z. vor der Injektion	C. Z. nach Injektion	
		nach 4 Stdn.	nach 24 Stdn.
1	23,4	32,5	22,9
2	30,8	45,2	28,0
3	54,0	57,2	51,0

Schon an und für sich sind die Tryptasezahlen nach Terpentinölinjektion, nach 4 Stunden, wo ein Abszeß immer bereits zu konstatieren war, größer als vorher; wie gesagt, sind aber diese Werte sicher noch höher zu veranschlagen. Nach 24 Stunden flaut die Wirkung ab und die Zahlen kehren zur Norm zurück. Um den umgekehrten Versuch zu machen, beraubten wir den Organismus seines hauptsächlichsten Leucocytendepots; wir exstirpierten die Milz.

Milzexstirpation. Auch dieser Versuch wurde, wie der vorige, an Kaninchen vorgenommen. Die Operation wurde natürlich vollkommen steril durchgeführt, was durch eine nachträgliche Sektion immer kontrolliert werden konnte.

Die entsprechenden Zahlen sind aus der Tabelle IV zu ersehen.

Tabelle IV.

Kaninchen Nr.	C. Z. vor der Operation	Zeit nach der Operation Stdn.	C. Z. nach der Operation
1	29,5	24	16,6
2	11,2	20	5,4
3	36,2	24	33,2
4	49,7	28	34,5

Wir sehen somit, daß die Milzexstirpation in allen Fällen zu einem Rückgang der Tryptasewerte des Blutserums führt. Es ist somit außer Zweifel, daß das Pankreastrypsin keine Bedeutung für die Serumtryptase besitzt; höchstwahrscheinlich wird es eben kaum rückresorbiert. Dagegen ist die Leucocytentryptase für das Serum ausschlaggebend. Schon die Milzexstirpation drückt die Zahlen bedeutend herab; konnte man experimentell den ganzen Lymphapparat entfernen, so würden die Zahlen sicher weiter Verminderung zeigen. Der Gegenversuch mit Provozierung einer künstlichen Leucocytose bestätigt die große Bedeutung der Leucocyten für die Serumtryptase.

Nicht unerwähnt möchten wir lassen, daß ein Kaninchen, welches im Verlauf von 11 Tagen immer anwachsende Tryptasenwerte gab, die schließlich 150 Proz. der Anfangszahl ergaben, am zwölften Tage starb. Bei der Sektion wurde eiterige Pneumonie gefunden. Wenn wir nochmals auf den Beginn unserer Ausführungen zurückgreifen und uns erinnern, daß wir Anlaß hatten zu glauben, daß die Organzellentryptasen wohl kaum einen merklichen Teil der Serumtryptasen ausmachen, wenn dasselbe für die Pankreastryptasen angenommen werden muß, so bleiben eben nur die Leucocyten im breiten Sinne des Wortes als Spender für die Serumtryptase nach.

Parenterale Einführung von Protein. Im Besitz einer Methode, welche die systoproteolytische Fähigkeit des Serums bei der Bestimmung der Serumtryptasen umgeht, schien es uns von Interesse, die Verschiebungen der Fermenttätigkeit bei parenteraler Proteinzufuhr zu verfolgen. Es wäre vielleicht einzuwenden, daß Casein in diesem Falle gerade ein ungeeignetes Substrat darstellt; nach *Rosenbaum*[1]) soll es selbst überhaupt keine Abwehrfermente hervorrufen. Andererseits ist es aber bekannt, daß gerade Milch und Casein die klassischen Präparate sind, welche bei der „Reiztherapie" so große Bedeutung gewonnen haben, auch ist es bekannt, daß gerade Milch bei Anaphylaxieversuchen gute Resultate gibt.

C. Oppenheimer und *Michaelis*[2]) haben schon vor vielen Jahren der Meinung Ausdruck gegeben, daß fremdes Protein in der Blutbahn die Leucocyten mobil macht. Wenn wir im vorigen zeigen konnten, daß die

[1]) *S. Rosenbaum*, diese Zeitschr. **103**, 30, 1920.
[2]) *C. Oppenheimer* und *L. Michaelis*, zitiert nach „Fermente", S. 1070.

Serumtryptasen zum großen Teil Leucocytentryptasen sind, so haben wir besondere Aussichten, deren Schwankungen nach erfolgtem „Reiz“ festzustellen.

Daß es die Leucocyten sind, die vor allen Dingen unter dem Einfluß des Reizes zerfallen, glaubt auch *Heilner*[1]).

Daß es nicht Organzellen sind, die das eingeführte körperfremde Protein verdauen, konnte *E. Abderhalden* selbst in einer Reihe von Abhandlungen zeigen.

Unsere ersten diesbezüglichen Versuche sollten in keiner Weise die Frage der Spezifität berühren; insofern war uns Casein als Substrat gerade sehr gelegen, da es als ein sehr leicht und von allen tryptischen Fermenten angreifbares Objekt uns vor allen Dingen über die *quantitative* Seite der erfolgten Verdauung nach Proteineinführung orientieren konnte.

Kaninchen führten wir intravenös entfettete Kuhmilch ein und bestimmten die Tryptasen an der Verdauung von Kuhmilchcasein und in einem Versuch auch an Ziegenmilchcasein. In allen Fällen erhielten wir dieselben Resultate: *nach etwa 3 Stunden war ein Sturz der Tryptasen zu beobachten, und dieses ist das Charakteristischste*; *nach 24 Stunden ist immer ein Anstieg zu sehen, welcher gewöhnlich die Anfangszahl überspringt.* Diese zweite Phase wäre somit diejenige, welche mit dem oft beschriebenen Auftreten von Proteasen nach Proteineinführung übereinstimmt. Was das Substrat anbetrifft, so scheint Kuhmilch ein Ferment zu produzieren, welches ebenso Ziegenmilchcasein verdaut: im entsprechenden Versuch haben wir genau das gleiche Bild beobachtet, Sturz und Anstieg über die Norm.

Tabelle Nr. 5 mag das Gesagte illustrieren.

Tabelle V.

Kaninchen Nr.	C. Z. vor der Einführung	Einführung von ccm	C. Z. nach 3 Stdn.	C. Z. nach 24 Stdn.	Substrat
		Kuhmilch			
1	33,8	1	18,1	51,6	Kuhmilchcasein
2	17,6	1	29,0	32,5	Kuhmilchcasein
		Ziegenmilch			
3	42,7	1	13,6	46,6	Kuhmilchcasein
4	19,3	1	6,9	27,1	Ziegenmilchcasein

Es ist somit zu sehen, daß durch den Reiz einer Einführung ins Blut eines sicher körperfremden Proteins die Tryptasenwerte sich in regelmäßiger Weise verschieben. Ist der Reiz einmal erfolgt, so ist das Substrat belanglos, insofern es Kuh- oder Ziegenmilchcasein ist;

[1]) *E. Heilner*, zitiert nach „Fermente“, S. 1070.



in bezug auf Casein sind, wie es scheint, die auftretenden Fermente nicht spezifisch.

Wir legten uns die Frage vor, ob die Anreicherung der Tryptasen im Serum in der zweiten Phase und der Sturz in der ersten zusammen in denselben Mechanismus hineingehören. Es war ja sicher nicht zu erwarten, daß ein Reiz und eine Anhäufung von Tryptasen auch dann auftreten würde, wenn wir einem stillenden Kaninchenweibchen Kaninchenmilchcasein einführen.

Wir wählten ein anderes Versuchsobjekt, eine melkende Ziege, der wir Ziegenmilch einführten und das Serum zu verschiedenen Zeitintervallen auf Tryptasen hin untersuchten (Tabelle VI).

Tabelle VI.

Ziege. Einführung von 3 ccm Ziegenmilch.

C. Z. vor der Einführung	C. Z. nach 3 Stdn.	C. Z. nach 24 Stdn.	C. Z. nach 2 × 24 Stdn.	Substrat
28,0	17,0	11,2	16,4	Ziegenmilchcasein
18,7	15,9	16,2	14,5	Kuhmilchcasein

Das gewöhnliche Bild der primären Verarmung des Serums an Tryptasen ist auch hier zu sehen — vielleicht in geringerem Maße, was auch Zufall sein kann —, ein Anstieg ist aber sicher nicht vorhanden. Es hängt somit der beobachtete Sturz wohl kaum mit dem Reiz zusammen, hat besondere Ursachen und hängt vielleicht mit einer primären Adsorption der vorhandenen Serumtryptasen an das eingeführte Protein und Wegtransport in die Leber zusammen.

Ein der Tabelle V vollkommen ähnliches Bild erhalten wir, wenn wir statt Milch Hühnereiweiß injizieren; als Substrat wurde auch in diesem Falle Ziegen- und Kuhmilchcasein verwendet. Wäre gerade dieses Substrat nicht so leicht von allerlei proteolytischen Fermenten angreifbar, so müßten wir von einer Entstehung unspezifischer Tryptasen reden, denn nach Einführung von Eiprotein werden nach 24 Stunden beide Caseine stärker verdaut.

Immerhin ist es erlaubt, zu verlangen, wenn man auf dem Standpunkt einer tatsächlichen Spezifität der nach Einführung artfremden Proteins auftretender Schutz- oder Abwehrfermente steht und dieses zu einem biologischen Gesetz erhebt, daß solche merkwürdige Ausnahmen, wie das Casein, nicht gerechtfertigt werden. Wenn wir mit klinischen Angaben über den „Abbau“ von einer Reihe von Substraten durch Seris von Kranken überhäuft sind, so ist dieses doch wenigstens immer durch multiorganische Störungen zu erklären. Im reinen Experiment ist ein jeglicher Versuch, einen unspezifischen Abbau zu erklären, auch immer ein Weg, die Spezifität in Zweifel zu setzen.

Die Tabelle VII illustriert den Versuch mit Hühnereiweiß; der anfängliche Sturz und spätere Anstieg sind gut ausgesprochen.

7*

Tabelle VII.

Kaninchen Nr.	C. Z. vor der Einführung	Einführung von 2 proz. Hühnereiweiß ccm	C. Z. nach 3 Stdn.	C. Z. nach 24 Stdn.	Substrat
1	37,7	1	13,2	49,0	Kuhmilchcasein
2	17,4	1	8,8	26,8	Ziegenmilchcasein

Um die Gewißheit zu gewinnen, daß Hühnereiweiß, in die Blutbahn eingeführt, Fermente produziert, die wohl Casein abbauen, aber nicht ein anderes beliebiges Protein, haben wir versucht, das Casein durch ein Organsubstrat zu ersetzen. Es war uns von der Arbeit *L. Utkin-Ljubowzows*[1]) her bekannt, daß auch Leberbreiaufschwemmung, im isoelektrischen Punkte koaguliert, die Tryptasen an sich reißt; in der angeführten Arbeit werden alle Tryptasen (mit dem Optimum $p_H > 7$) im Koagulum gefunden. Wir bedienten uns jener Methode im gegebenen Falle, in dem zu 1 ccm Serum 3 ccm 20proz. Leberaufschwemmung und 0,5 ccm des Puffers $p_H = 4,5$ hinzugegeben wurde. Der Niederschlag wurde dann genau wie der Caseinniederschlag weiterbehandelt und unter denselben Bedingungen verdaut.

Es mußte aber zuerst als Kontrolle festgestellt werden, daß die normalen Serumtryptasen unter den gegebenen Bedingungen ein solches Leberbreikoagulum verdauen. Daß dieses tatsächlich der Fall ist, zeigt die Tabelle VIII.

Tabelle VIII.

Kaninchen Nr.	Versuchsanordnung	Verdauung in Proz.
1	1 ccm 0,9 proz. ClNa + 3 ccm 5 proz. Leberbreiaufschwemmung + 0,5 ccm Puffer $p_H = 4,5$ (Kontr.) . .	9,1
	1 ccm Serum + 3 ccm 5 proz. Leberbreiaufschwemmung + 0,5 ccm Puffer $p_H = 4,5$ (Vers.)	28,9
2	1 ccm 0,9 proz. ClNa + 3 ccm 5 proz. Leberbreiaufschwemmung + 0,5 ccm Puffer $p_H = 4,5$ (Kontr.) . .	9,7
	1 ccm Serum + 3 ccm 5 proz. Leberbreiaufschwemmung + 0,5 ccm Puffer $p_H = 4,5$ (Vers.)	17,8

Die Tabelle IX zeigt die Verschiebungen der Verdauungswerte von Leberbrei nach Einführung von 1 ccm 2proz. Hühnereiweißlösung. Wie wir früher gesehen haben, ruft eine solche Injektion eine Verstärkung der Caseinverdauung nach 24 Stunden hervor. Dieses Plus an Ferment ist also sicher vorhanden, daß es aber nicht Leberbrei zu verdauen vermag, ersehen wir aus der Tabelle IX.

Wie man ersieht, sind die Verdauungswerte überhaupt sehr niedrig. Eine primäre Verminderung ist vorhanden, aber auch klein. In keinem

[1]) *L. Utkin-Ljubowzow*, diese Zeitschr. **158**, 50, 1926.

Tabelle IX.

Kaninchen Nr.	Leberbreiverdauung vor der Injektion	Injektion von 2 proz. Hühnereiweiß ccm	Leberbreiverdauung nach 3 Stdn.	Leberbreiverdauung nach 24 Stdn.
1	11,1	1	7,0	8,8
2	9,0	1	8,2	8,6
3	6,2	1	6,0	6,4

Falle aber übertrifft die Verdauung den Anfangswert. Das vorhandene Ferment ist somit nicht imstande, das Leberbreikoagulum anzugreifen. Dieses Resultat ist also sicher im Sinne einer gewissen Spezifität zu deuten oder jedenfalls nicht im Sinne einer vollkommenen Unspezifität; wir wissen eben nicht, ob das produzierte Ferment außer dem leicht und von vielen Fermenten angreifbaren Casein eben nur noch Hühnereiweiß abbaut.

Wir waren selbstverständlich überzeugt, daß, wenn wir nun Leberemulsion in die Vene spritzen, wir doch sicher das bekannte Bild des Anstiegs (nach eventueller Verminderung) der Tryptasenwerte beobachten werden. Unser Erstaunen war groß, als dieses *nicht eintrat.* Vom Standpunkt der *Abderhalden*schen Lehre *muß* doch Leberprotein blutfremd sein, wenngleich das in diesem Falle eingeführte Protein nicht artfremd war. Wir glaubten annehmen zu müssen, daß, wie bereits aus den Tabellen VIII und IX zu ersehen ist, die Leberproteinverdauung derartig träge ist, daß eine vielleicht auftretende Anreicherung an Tryptasen durch physiologische, aus anderen Gründen, zufällige Verarmung verdeckt wird, denn die physiologischen Tagesschwankungen dürfen ja auch nicht vernachlässigt werden. Um Gewißheit zu gewinnen, führten wir in zwei anderen Versuchen Casein als Substrat ein. *Dieses* so leicht und stark und immer verdaubare Substrat *mußte* eine Anreicherung widerspiegeln. Aber auch in diesem Falle, trotz sehr hoher Verdauungszahlen, war nichts von einem Auftreten von Tryptasen zu beobachten, die Werte blieben dieselben. Die Versuche sind in Tabelle X zusammengefaßt.

Tabelle X.

Einführung von 2 ccm Leberbreiaufschwemmung.

Kaninchen Nr.	Verdauungszahl vor dem Versuch	Verdauungszahl nach 3 Stdn.	Verdauungszahl nach 24 Stdn.	Substrat
1	9,5	8,4	9,2	Leberprotein
2	14,5	13,1	13,3	"
3	16,7	11,7	13,2	"
4	54,6	—	51,5	Casein
5	44,6	41,8	44,2	"

Wir wagen es nicht, aus diesem letzten Versuch irgendwelche entscheidende Schlüsse zu ziehen. Wir wollen nur unsere Beobachtung festgestellt haben, die uns auf die Fragestellung hinüberführt, ob vielleicht die eingeführte Proteinmenge zu gering ist (was wir bezweifeln), ob vielleicht das entsprechende Ferment später auftritt als nach 24 Stunden (was immerhin möglich ist), ob schließlich andere Organproteine sich anders als Leberprotein aufführen.

Darüber zu berichten, werden wir demnächst bemüht sein.

Die Ergebnisse unserer Untersuchungen können wir *zusammenfassend* folgenderweise formulieren:

Nach der in unserem Laboratorium ausgearbeiteten Methode der Tryptasenbestimmung im Serum zu urteilen, ist die Serumtryptase hauptsächlich wohl Leucotryptase, denn die für Organzellen charakteristischen Pepsinasen sind im Serum in geringerem Maße enthalten, und Pankreasexstirpation führt nicht zu einem Sturze der Serumtryptasenwerte. Für diese Annahme spricht auch der Anstieg der Tryptasenwerte nach Provozierung eines sterilen Abszesses und Absinken nach Milzexstirpation. Endgültig kann die Frage nach genauem Vergleich der Wirkungsoptima der Serumproteasen (s. nächste Mitteilung) mit jenen der Leucocyten entschieden werden.

Einführung von Milch und Eiproteinen in die Blutbahn gibt anfänglich Sturz und, sekundär, Anstieg der Tryptasenwerte im Serum nach 24 Stunden. Die diesbezüglichen Versuche wären vielleicht im Sinne einer Spezifität zu deuten, denn die nach Eiweißprotein auftretenden Fermente verdauen nicht Leberprotein. Merkwürdigerweise treten aber nach Leberproteininjektion in die Blutbahn überhaupt keine Tryptasen auf. Versuche mit anderen Organen sind an der Reihe.

Zur Kenntnis der Blutproteasen.

Von

L. Utkin-Ljubowzow.

(Aus dem staatlichen chemo-pharmazeutischen Forschungsinstitut in Moskau.)

(Eingegangen am 12. Januar 1927.)

Während in den letzten Jahren das Studium proteolytischer Fermente der Organe bedeutende Fortschritte aufzuweisen hat, blieb die Frage der Blutproteasen bis heute nicht genügend berücksichtigt. Dieses betrifft nicht nur solche Seiten des Problems, wie z. B. die Rolle der Blutproteasen im Eiweißhaushalt des normalen und kranken Organismus, oder den Ursprung dieser Proteasen; sogar das Wesen der Blutproteasen ist nicht genügend aufgeklärt, es fehlt die genügende Differenzierung der einzelnen proteolytischen Fermente. Die erste der hier genannten Fragen lasse ich unberührt; was die zweite betrifft — über den Ursprung der Blutproteasen —, so sei im voraus bemerkt, daß die Lösung dieses Problems eine möglichst volle Kenntnis der Eigenschaften dieser Proteasen verlangt, da auf dem Wege des Vergleichs eine Identifizierung mit anderen von einzelnen Teilen des Organismus gelieferten Proteasen möglich wird. Als eine für jedes Ferment höchst charakteristische Eigenschaft ist die für seine Arbeit optimale Reaktion des Milieus. In der Literatur besitzen wir bereits Angaben über Serumproteasen in der Arbeit von *Okubo*[1]), welcher ein Wirkungsoptimum bei $p_H = 7$ feststellte. *Jobling*[2]) jedoch ist der Meinung, daß das Ferment auch in saurem Milieu aktiv ist. Wir wissen zwar nicht, welches p_H das Milieu von *Jobling* besaß, doch bedienten wir uns des Hinweises von *Jamakava*[3]), daß zu beiden Seiten des optimalen Punktes ein rasches Abklingen der Proteasenaktivität beobachtet wird; dieses gibt uns Anrecht, die Existenz von zwei Blut-

[1]) Ber. Phys. 27, 195; 28, 467.
[2]) Zitiert nach *Oppenheimer*, Die Fermente usw., S. 1067.
[3]) Journ. of exper. Med. 27, 689, 711; zitiert nach *Oppenheimer*, l. c., S. 1067.



fermenten vorauszusetzen; das erste ist schon annähernd bekannt und kann zum Tryptasentypus gerechnet werden; über das zweite besitzen wir vorläufig überhaupt keine Angaben, außer der oben genannten Angabe von *Jobling*.

Indem ich mir die Aufgabe eines gründlichen Studiums optimaler Milieuverhältnisse der Arbeit proteolytischer Blutfermente, besser gesagt Serumfermente, stellte, entschloß ich mich, zur Lösung dieser Frage in der Weise herauszutreten, daß alle Faktoren, die so oder anders die Versuchsresultate beeinflussen könnten, ausgeschlossen bleiben.

Von diesem Standpunkt aus erscheint das Verfahren besonders praktisch, welches in unserem Laboratorium zur Bestimmung der Blutproteasen angewandt wird; diese Methode erlaubt, alle Bestandteile des Serums zu eliminieren und die Wirkung der Protease in einem Milieu, dessen Bestandteile bekannt sind, zu beobachten. Diese von uns angewandte Methode unterscheidet sich vorteilhaft von allen anderen, welche mit Serum in toto operieren und Anwendung von stark wirkenden Agenzien zur „Zerstörung" des sich im Serum befindenden Antitrypsins, welches störend auf die Arbeit der Protease wirkt, verlangen. Die Methode beruht auf einer Proteasenadsorption durch das im isoelektrischen Punkte ausfallende Casein. Der Caseinniederschlag kann mit Wasser oder einer beliebigen Lösung ausgewaschen werden, was die Entfernung von Serumeiweißstoffen und seiner löslichen Bestandteile bezweckt. Der ausgewaschene Niederschlag wird in schwacher Sodalösung gelöst; mit dieser Lösung wird dann der Versuch angestellt.

Im Anfang steckte ich mir das Ziel einer Kontrolle der von *Okubo* erhaltenen Resultate betreffend das Wirkungsoptimum der Serumtryptase.

Im einzelnen war die Versuchsanordnung folgende: 1 Volumen Serum wurde mit 3 Volumen 1proz. neutraler Caseinlösung vermengt (in manchen Fällen wandte ich verhältnismäßig weniger Serum an, 1 Volumen zu 6 Volumen Casein; die Resultate wurden dadurch in keiner Weise beeinflußt, nur die absoluten Verdauungszahlen waren niedriger). Zu dem Gemenge wurde 1 Volumen Acetatpuffer, das aus gleichen Teilen von Normallösungen von Natriumacetat und Essigsäure zubereitet war, hinzugegeben. Nach kurzem Stehenlassen wurde der Niederschlag abfiltriert und zweimal mit Wasser oder demselben 100fach verdünnten Acetatpuffer ausgewaschen. Später erwies es sich als praktischer, den Niederschlag zu zentrifugieren und auch auf der Zentrifuge zu waschen. Der Niederschlag wurde in einen Kolben eingetragen, mit 20 ccm 0,2proz. Sodalösung übergossen und bis zur Lösung des Caseins stehengelassen, was gewöhnlich rasch geschieht. Nach Auflösung wurde Wasser bis zu einem bestimmten Volumen aufgefüllt und die Lösung filtriert. Von dem erhaltenen Filtrat wurden je 10 ccm mit 10 ccm Pufferlösungen in *Erlenmeyer*schen Kölbchen gemischt und nach Zugabe von Toluol für 24 Stunden oder mehr im Thermostaten

bei 37° stehengelassen. Nach einer bestimmten Zeit wurden aus jedem Kolben 5 ccm Flüssigkeit zur elektrometrischen Bestimmung von p_H entnommen; in dem Rest wurde das Eiweiß durch kolloidales Eisenoxyd gefällt und im Filtrat der Reststickstoff nach *Kjeldahl* (mikro) bestimmt. Der Rest-N-Zuwachs gegenüber dem anfänglichen Rest-N diente als Maßstab der Proteaseaktivität. Als Puffer wurden m/15 Phosphat-, m/10 Acetat- und Lactatmischungen angewandt.

Die Versuchsresultate sind in den folgenden Tabellen zusammengefaßt.

Versuch 1.

Kaninchenserum. Phosphatpuffer. Dauer 23 Stunden.
Vor dem Versuch Rest-N = 0,28 mg.

	1.	2.	3.	4.
p_H, elektrometrische	8,11	7,65	7,36	6,98
Rest-N	0,42	0,59	0,73	1,19
Rest-N-Zuwachs	0,14	0,31	0,45	0,91

Dieser erste Versuch zeigt klar genug die Aktivitätsvergrößerung der Protease je nach Reaktionsveränderung des Milieus in der Richtung alkalisch-neutral. Die beiden weiteren Versuche 2 und 3 sind nicht weniger demonstrativ in Hinsicht des Aktivitätssturzes beim Überschreiten des neutralen Punktes und einer weiteren Säuerung.

Versuch 2.

Kaninchenserum. Acetatpuffer; in Versuch 1 und 2 durch Soda alkalisiert.
Dauer 42½ Stunden. Vor dem Versuch Rest-N = 0,16 mg.

	1.	2.	3.	4.
p_H, elektrometrische	7,49	**7,06**	5,35	4,65
Rest-N	0,87	0,93	0,29	0,24
Rest-N-Zuwachs	0,71	**0,77**	0,13	0,08

Versuch 3.

Kaninchenserum. Acetatpuffer. Dauer 23½ Stunden.
Vor dem Versuch Rest-N = 0,12 mg.

	1.	2.	3.	4.
p_H, elektrometrische	6,69	6,21	5,87	5,31
Rest-N	0,78	0,70	0,52	0,29
Rest-N-Zuwachs	0,66	0,58	0,40	0,17

Versuch 4.

Kaninchenserum. Phosphatpuffer. Dauer 23 Stunden.
Vor dem Versuch Rest-N = 0,15 mg.

	1.	2.	3.	4.	5.
p_H, elektrometrische	7,30	**7,02**	6,70	6,37	5,93
Rest-N	0,86	**1,24**	0,98	0,89	0,62
Rest-N-Zuwachs	0,71	**1,09**	0,83	0,74	0,47

Versuch 5.

Kaninchenserum. Phosphatpuffer. Dauer 25 ½ Stunden.
Vor dem Versuch Rest-N = **0,15 mg.**

	1.	2.	3.	4.	5.
p_H, elektrometrische . .	7,40	7,22	7,01	**6,88**	6,66
Rest-N	0,77	0,78	0,81	0,86	0,75
Rest-N-Zuwachs	0,62	0,63	0,66	**0,71**	0,60

In allen hier angeführten Versuchen grenzt das Wirkungsoptimum der Serumprotease, was Caseinverdauung anbetrifft, an die neutrale Reaktion, d. h. an $p_H = 7$. Eine unbedeutende Abweichung nach der sauren Richtung im Versuch 5 ist kaum von Belang, da die Grenzen eines Versuchsfehlers sicher nicht überschritten sind. Somit können wir mit Bestimmtheit sagen, daß das Wirkungsoptimum eines Kaninchenserums bei der neutralen Milieureaktion ($p_H = 7$) liegt, was vollkommen mit den von *Okubo* gewonnenen Ergebnissen übereinstimmt. Was den Aktivitätssturz der Serumprotease zu beiden Seiten des optimalen Punktes, von dem *Jamakava* spricht, anbetrifft, so konnte dieser in unseren Versuchen als Regel nicht beobachtet werden. Jedenfalls kann von einem *bedeutenden* Aktivitätsschwund nur im Falle einer Reaktionsveränderung nach der sauren Seite hin die Rede sein. Versuchen wir aber, die Aktivität in der Richtung einer Verminderung der Wasserstoffionenkonzentration zu verfolgen, so werden wir die Beobachtung machen, daß das Ferment sogar im Falle einer starken Alkalität des Milieus zu arbeiten fortfährt (Versuch 1).

Die weiteren zwei Versuche mit Hundeserum zeigen, daß ein Arbeitsoptimum der Protease auch in diesem Falle nahe $p_H = 7$ liegt.

Versuch 6.

Hundeserum. Phosphatpuffer. Dauer 67 Stunden.
Vor dem Versuch Rest-N = 0,36 mg.

	1.	2.	3.	4.	5.	6.
p_H, elektrometr.	7,45	7,25	7,05	6,89	**6,78**	6,56
Rest-N	1,75	1,79	1,81	1,92	2,00	1,89
Rest-N-Zuwachs	1,39	1,43	1,45	1,59	**1,67**	1,56

Versuch 7.

Hundeserum. Acetatpuffer. Dauer 25 Stunden.
Vor dem Versuch Rest-N = 0,10 mg. Versuche 1, 2, 3 durch Soda alkalisiert.

	1.	2.	3.	4.	5.	6.
p_H, elektrometr.	9,03	8,07	7,66	**6,80**	5,35	4,98
Rest-N	0,23	0,85	1,35	1,40	0,13	0,10
Rest-N-Zuwachs	0,13	0,75	1,25	**1,30**	0,03	0,00

In beiden Versuchen mit Hundeserum zeigt sich am deutlichsten ein sehr langsames Abklingen der Proteasewirkung in der Richtung vom Optimum nach der alkalischen Seite hin.

Es bestätigen die hier angeführten Versuche die von *Okubo* gewonnenen Resultate und geben uns zur selben Zeit die Möglichkeit, den Schluß zu ziehen, daß die Serumtryptase nicht mit dem Trypsin des Pankreas identifiziert werden kann, da letzteres ein weit alkalischeres Wirkungsoptimum besitzt.

Indem ich jetzt zu der zweiten Aufgabe schreite, nämlich zur Klärung der Frage über die Existenz eines proteolytischen Ferments im Serum, mit einem Wirkungsoptimum im sauren Milieu — der Pepsinase —, muß ich bemerken, daß, wenn die Existenz einer Tryptase — das Resultat der Arbeiten anderer Verfasser (*Jobling*, *Okubo*) — als unbestrittene Tatsache vorlag, die Existenz einer Pepsinase im Gegenteil nur vorausgeahnt werden konnte. Die Voraussetzung so einer Existenz konnte ich nur darauf gründen, daß die Pepsinase mit ihrem Wirkungsoptimum in stark saurem Milieu in Organen aufgefunden wurde; selbstverständlich konnte sie auch ins Blut gelangen. Deshalb begann ich die entsprechenden Versuche mit Pufferlösungen, welche mit dem Pepsinaseoptimum der Leber in unseren diesbezüglichen Versuchen entsprachen, d. h. $p_H = 3{,}6$ bis 3,8 für Leberautolyse (*Rona* und *Mislowitzer*) oder $p_H = 3{,}0$ bis 3,4 für Caseinspaltung durch Leberpepsinase (*L. Utkin-Ljubowzow*). Die Methodik war anfänglich dieselbe wie für Serumtryptase.

Der erste Versuch in dieser Richtung erwies sich als mißlungen, da die Caseinspaltung zu unbedeutend war, um aus den erhaltenen Zahlen irgendwelche Schlüsse ziehen zu können (Versuch 8).

Versuch 8.

Hundeserum. Acetatpuffer. Dauer 67 Stunden.
Vor dem Versuch Rest-N = 0,10 mg.

	1.	2.	3.	4.	5.
p_H, elektrometrische . .	5,04	4,64	4,24	3,92	3,64
Rest-N	0,13	0,10	0,13	0,15	0,15
Rest-N-Zuwachs	0,03	0,00	0,03	0,05	0,05

Der erste Gedanke, der beim Anblick dieser Tafel auftaucht, ist der, daß die im sauren Milieu arbeitende Protease durch das Casein, welches im isoelektrischen Punkte ausfällt, nicht adsorbiert wird, da eine Caseinspaltung zwar vorhanden, doch so gering ist, daß der Gedanke an irgendwelche Fermentreste, die zufällig im Casein nach dessen Auswaschung verbleiben, naheliegt. Da bei den Versuchen mit Pepsinase

die Anwesenheit von Antitrypsin keine Bedeutung hat und das von mir angewandte Verfahren speziell zur Trennung des Ferments von Antitrypsin und den Serumproteinen bestimmt ist, so benutzte ich die Gelegenheit, um meine Versuche unmittelbar mit Serum anzustellen. Der Versuch 9, in dem als Substrat für die Pepsinasewirkung das Serumprotein selbst diente, zeigte, daß das Serum eine Pepsinase enthält, obgleich die Spaltung — im gegebenen Falle die Autolyse — nicht bedeutend war.

Versuch 9.

Hundeserum. Acetatpuffer. Dauer 67 Stunden. In jedem Kolben à 5 ccm Serum verdünnt 1 : 5. Vor dem Versuch Rest-N = 0,33 mg.

	1.	2.	3.	4.	5.
p_H, elektrometrische . .	4,62	4,32	4,08	3,82	3,46
Rest-N	0,39	0,39	0,45	0,49	0,52
Rest-N-Zuwachs	0,06	0,06	0,12	0,16	0,19

Um die Resultate deutlicher zu gestalten, stellte ich einige Versuche in der Weise an, daß ich das Serumprotein durch das leichter spaltbare ersetzte. Dabei gewann ich ein klares Bild einer Aktivitätszunahme des Ferments in Abhängigkeit von einer Vergrößerung der Wasserstoffionenkonzentration, wie es aus den Versuchen 10 und 11 hervorgeht.

Versuch 10.

Hundeserum (dasselbe). Acetatpuffer. In jedem Kolben à 5 ccm Serum 1 : 5 und à 3 ccm 1 proz. Caseinlösung. Dauer 67 Stunden. Vor dem Versuch Rest-N = 0,35 mg.

	1.	2.	3.	4.	5.	6.
p_H, elektrometr.	4,62	4,32	4,10	3,87	3,66	3,39
Rest-N	0,38	0,50	0,67	0,97	1,53	1,75
Rest-N-Zuwachs	0,03	0,15	0,32	0,62	1,18	1,40

Versuch 11.

Hundeserum. Lactatpuffer. Bestandteile der Mischung dieselben wie in Versuch 10. Dauer 50 Stunden. Vor dem Versuch Rest-N = 0,38 mg.

	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.
p_H, elektrometr.	4,20	3,99	3,79	3,57	3,34	2,98	2,83
Rest-N	0,53	0,65	0,80	1,01	1,37	1,84	2,56
Rest-N-Zuwachs	0,15	0,27	0,42	0,63	0,99	1,46	2,18

Die angeführten Versuche zeigen auf der ganzen Skala der Wasserstoffionenkonzentration, auf welcher ein Wirkungsoptimum der Caseinspaltung für die Leberpepsinase liegt, nur einen Aktivitätszuwachs, was wiederum darauf hinweist, daß eine optimale Reaktion des Milieus saurer sein muß. Die nächsten zwei Versuche 12 und 13 zeigen, daß als Optimum p_H etwa 2,4 bis 2,6 zu setzen ist.

Versuch 12.

Hundeserum. Lactatpufter. Dauer 47 Stunden. Vor dem Versuch Rest-N = 0,36 mg.

	1.	2.	3.	4.	5.
p_H, elektrometrische . .	3,55	3,25	2,97	**2,65**	2,40
Rest-N	1,06	1,38	2,00	2,82	1,83
Rest-N-Zuwachs	0,70	1,02	1,64	**2,46**	1,47

Versuch 13.

Kaninchenserum. Lactatpuffer. Dauer 47 Stunden. Vor dem Versuch Rest-N = 0,43 mg.

	1.	2.	3.	4.	5.	6.
p_H, elektrometr.	3,54	3,25	2,95	2,67	**2,37**	2,10
Rest-N . . .	0,67	1,16	1,30	1,82	2,56	2,05
Rest-N-Zuwachs	0,24	0,73	0,87	1,39	**2,18**	1,62

Vergleichen wir aber das gewonnene Wirkungsoptimum mit den Resultaten der Versuche 14 und 15, so müssen wir gestehen, daß hier nicht alles so klar ist, wie man erwarten könnte, denn die Versuche 14 und 15 geben ein Optimum, welches in weniger saurem Milieu liegt, d. h. bei p_H etwa 3,0 bis 3,2, also mit dem Optimum der Leberpepsinase bei ihrer Einwirkung auf Casein zusammenfallen.

Versuch 14.

Kaninchenserum. Lactatpuffer. Dauer 91 Stunden. Vor dem Versuch Rest-N = 0,44 mg.

	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.
p_H, elektrometr.	4,26	4,03	3,83	3,39	3,21	**3,00**	2,82
Rest-N	0,57	0,64	0,75	1,13	1,47	2,32	2,24
Rest-N-Zuwachs	0,13	0,20	0,31	0,69	1,03	**1,88**	1,80

Versuch 15.

Kaninchenserum. Lactatpuffer. Dauer 41 Stunden.
Vor dem Versuch Rest-N = 0,34 mg.

	1.	2.	3.	4.	5.	6.
p_H, elektrometr.	3,80	3,67	3,53	3,38	**3,25**	3,11
Rest-N	0,60	0,71	0,77	0,86	0,96	0,67
Rest-N-Zuwachs	0,26	0,37	0,43	0,52	**0,62**	0,33

Die Widersprüche in den erhaltenen Resultaten zwangen mich zu einem Verzicht auf die von mir angenommene Methodik; ich griff wieder zu dem Verfahren, welches zur Tryptasenbestimmung angewandt wurde, indem ich es nur den Eigenschaften der Pepsinase gemäß änderte.

Wie bekannt, ist nicht nur die Magenpepsinase, sondern nach *Rona* und *Mislowitzer* auch die Leberpepsinase durch Alkali leicht zerstörbar; daraus folgt, daß bei Anwendung unserer Methode die Pepsinase, wenn sie durch Casein adsorbiert wird, einer starken Zerstörung im Stadium der Bearbeitung des Caseinniederschlags mit Sodalösung unterliegt. Aus diesem Grunde versuchte ich, den Niederschlag aufzulösen, indem ich ihn in Wasser suspendierte und vorsichtig eine n/10 Lösung von HCl dazugab. In diesem Falle erhielt ich sofort befriedigende Resultate.

Versuch 16.

Kaninchenserum. Lactatpuffer. Dauer 68 Stunden.
Vor dem Versuch Rest-N = 0,10 mg.

	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.
p_H, elektrometr.	3,87	3,60	3,37	3,11	2,85	**2,63**	2,33
Rest-N	0,17	0,21	0,25	0,33	0,40	0,45	0,32
Rest-N-Zuwachs	0,07	0,11	0,15	0,23	0,30	**0,35**	0,22

In den Versuchen 16 und 12 wurde das Verdauungsmaximum des Caseins bei $p_H = 2,6$ beobachtet, weiter beginnt ein Abklingen der Kurve. Analoge Resultate mit den hier angeführten ergaben die Versuche 17 und 18.

Versuch 17.

Kaninchenserum. Lactatpuffer. Dauer 92 Stunden.
Vor dem Versuch Rest-N = 0,13 mg.

	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.
p_H, elektrometr.	3,64	3,40	3,17	2,92	**2,67**	2,43	2,16
Rest-N	0,30	0,33	0,41	0,54	0,62	0,54	0,43
Rest-N-Zuwachs	0,17	0,20	0,28	0,41	**0,99**	0,38	0,30

Versuch 18.

Kaninchenserum. Lactatpuffer. Dauer 95 Stunden.
Vor dem Versuch Rest-N = 0,11 mg.

	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.
p_H, elektrometr.	3,59	3,40	3,10	2,92	**2,62**	2,42	2,17
Rest-N	0,23	0,33	0,42	0,50	0,57	0,54	0,33
Rest-N-Zuwachs	0,12	0,22	0,31	0,39	**0,46**	0,43	0,22

Die hier angeführten Versuche sprechen mit Bestimmtheit für die Anwesenheit eines proteolytischen Ferments im Blutserum, welches in stark saurem Milieu aktiv ist. Was sein Wirkungsoptimum anbetrifft, so liegt dasselbe in einem Milieu, welches saurer ist als ein solches für die Leberpepsinase. So bleibt die Frage über den Ursprung dieses proteolytischen Ferments vorläufig unaufgeklärt. Es sollte scheinen, daß es am einfachsten wäre, als Quelle dieses Ferments die Magensaftdrüsen zu bezeichnen, doch haben wir für diese Vorstellung keine gewichtigen Gründe, da das Wirkungsoptimum des Magenpepsins einem $p_H = 1,6$ bis 1,8 entspricht, während das Wirkungsoptimum für die Serumpepsinase bei $p_H = 2,5$ bis 2,7 liegt, also im Milieu mit einer geringeren H-Ionenkonzentration. Abgesehen davon müßte eine Rückresorption aus dem Magendarmtraktus angenommen werden, wofür sicher keine Anhaltspunkte vorliegen. Als Endresultat besitzen wir im Serum zwei Fermente, die Tryptase und Pepsinase, und keines von beiden können wir sicher mit irgend einem von den uns bekannten proteolytischen Organfermenten identifizieren. Was die Serumtryptase anbetrifft, so ist in der vorhergehenden Mitteilung die Meinung ausgesprochen, daß sie leucocytären Ursprungs sei. Es fehlen endgültige Beweise. Immerhin ist es erwähnenswert, daß *Dernby*[1]) bei einer anderen Versuchsanordnung für die Leucoprotease ein Optimum bei $p_H = 3$ fand und *Nye*[2]) ein Maximum bei $p_H = 7$. Vereinigt man diese beiden Angaben, so erhält man Zahlen, die den von mir für Serumproteasen gefundenen ziemlich genau entsprechen. Zur endgültigen Klärung dieser Frage müßten die optimalen Punkte der Leucoprotease mit derselben Methode bestimmt werden.

Zusammenfassung.

1. Das Serum von Kaninchen und Hunden enthält eine Protease (Tryptase), deren Wirkungsoptimum gegen Casein bei $p_H = 7$ (6,7 bis 7,1) liegt, was vollkommen mit den von *Okubo* erhaltenen Resultaten übereinstimmt.

---

[1]) *K. Dernby*, Journ. of biol. Chem. **35**, 179.
[2]) *R. Nye*, Journ. of exper. Med. **35**, 153.

2. Die Aktivität dieser Protease fällt rasch mit einer Vergrößerung der Wasserstoffionenkonzentration und viel langsamer mit einer Verminderung ab.

3. Das Serum enthält eine zweite Protease (Pepsinase) mit dem Wirkungsoptimum gegen Casein bei $p_H = 2{,}5$ bis 2,7.

4. Die gefundenen Proteasen sind sicher nicht mit den Fermenten des Magendarmtraktus zu identifizieren, was die Annahme einer eventuellen Rückresorption ausschließt. Die am meisten gerechtfertigte Meinung, die aus experimentellen (s. auch vorige Mitteilung) und theoretischen Betrachtungen erwächst, daß die Serumprotease hauptsächlich Leucoprotease ist, wäre unter anderem durch ein dieser Arbeit analoges Studium der Leucocyten zu ergänzen.

Über den Gehalt von Weizen- und Roggenkeimen an Vitaminen.

Von

Arthur Scheunert.

(Aus dem veterinär-physiologischen Institut der Universität Leipzig.)

(Eingegangen am 12. Januar 1927.)

Mit 4 Abbildungen im Text.

Unter den zu Ernährungs- und Futterzwecken verwendeten, bei der Vermahlung gewinnbaren Teilen des Getreidekorns wird dem Keimling, dem Embryo, wenig Beachtung geschenkt. Dies mag mit seiner, infolge des relativ hohen Fettgehalts gegenüber den anderen Teilen des Korns, geringeren Haltbarkeit und auch mit seinem etwas strengen Geschmack zusammenhängen. So kommt es, daß die Keime beim Mahlprozeß meist nicht abgetrennt werden, sondern in die Kleie fallen.

Honcamp, *Neumann* und *Müller*[1]) untersuchten vergleichend Roggen- und Weizenkeime auf ihre Verdaulichkeit bei Hammeln und Schweinen und fanden dabei folgende Werte:

	Organ. Substanz Proz.	Roh-protein Proz.	Roh-fett Proz.	Stickstoff-freie Extraktiv-stoffe Proz.	Roh-faser Proz.
Roggenkeime, Zusammensetzung . .	94,56	31,09	9,7	49,88	3,88
Hiervon waren verdaulich { Schaf	91,7	91,8	90,5	91,5	91,4
Hiervon waren verdaulich { Schwein	83,5	86,4	90,8	87,8	67,7
Weizenkeime, Zusammensetzung . .	94,79	32,21	7,8	52,62	2,16
Hiervon waren verdaulich { Schaf	89,3	93,8	89,4	91,1	—
Hiervon waren verdaulich { Schwein	86,9	90,1	85,5	88,1	41,3

[1]) Landw. Versuchsst. 81, 205, 1913.



Der hohe Eiweißgehalt und die hohe Verdaulichkeit lassen somit die Keime als hochverdauliches, höchst wertvolles Futtermittel erscheinen. Nach den angeführten Untersuchungen enthalten die *Roggenkeime 21,23 Proz. verdauliches Eiweiß* und *75,8 Proz. Stärkewert* (nach *Kellner*), die *Weizenkeime 21,97 Proz. verdauliches Eiweiß und 74,7 Proz. Stärkewert.*

Diesen Befunden entsprechen neuere von *Honcamp* und *Pfaff*[1]) und *Scheunert, Klein* und *Steuber*[2]) mit Roggenkeimen. Bei Hammeln wurden hier in der Trockensubstanz 22,87 Proz. (*Honcamp* und *Pfaff*) und 21,12 Proz. (*Scheunert, Klein* und *Steuber*) verdauliches Eiweiß sowie rechnerisch Stärkewerte von 83,15 und 83,44 gefunden. Als der Nährwert der Roggenkeime im Respirationsversuch experimentell ermittelt wurde, erwies er sich als wesentlich höher. *Scheunert, Klein* und *Steuber* fanden bei einem Tier auf diese Weise 113,4.

Wenn durch diese Zahlen auch der hohe Nährwert der Getreidekeime deutlich hervorgehoben wird, so wird er mit ihrer Hilfe in seinem ganzen Umfange aber immer noch bei weitem nicht richtig erfaßt. Dies ist erst möglich, wenn auch die qualitative Beschaffenheit des Keimes berücksichtigt wird. *McCollum* ist es gewesen, der in dieser Richtung darauf hinwies, daß der Keim der qualitativ wertvollste Teil des Kornes ist. Da aus ihm die neue Pflanze hervorgeht, muß er alle lebensnotwendigen Bestandteile in günstigen Mengenverhältnissen enthalten, d. h. er muß eine für den Ablauf der Lebensvorgänge und Assimilationen des werdenden neuen pflanzlichen Organismus optimale Zusammensetzung haben. Die übrigen Teile des Kornes sind demgegenüber nur als Reservematerial aufzufassen. Der Keim steht somit den grünen Blättern, in denen die wesentlichen Stoffwechselvorgänge ablaufen, und den Organen der Tiere nahe, die ebensolchen Funktionen obliegen. Die Qualität des im Embryo enthaltenen Mineralstoffgemischs und die seiner Eiweißkörper muß demnach für Ernährungszwecke eine sehr gute sein, und weiter muß der Keim auch Vitamine enthalten. In der Tat haben *McCollum, Simmonds* und *Pitz*[3]) festgestellt, daß Weizenkeime alle zum Wachstum und Wohlbefinden eines Tieres notwendigen Bestandteile enthalten. Ein Mangel besteht nur insofern, als die gegenseitigen Mengenverhältnisse dieser Bestandteile ungünstige sind, so daß ohne Abänderung derselben ein Wachstum nicht möglich ist, insbesondere muß auch der Mineralstoffgehalt modifiziert werden. Die Eiweißkörper der Keime sind von vorzüglicher Qualität. Alles das läßt es angezeigt erscheinen, den Keimen für alle Ernährungszwecke eine erhöhte Aufmerksamkeit zuzuwenden, sie insbesondere zur Ergänzung vermutlich unterwertiger Rationen heranzuziehen und auch bei der menschlichen Ernährung zu gleichen Zwecken zu verwenden. Auf letzteres hat meines Wissens als erster *P. Bergell* aufmerksam gemacht, und es wird gegenwärtig von der Nährmittelfabrik Dr. *Klopfer* ein Präparat namens *Materna* (aus geschmacklichen Gründen auch mit Zucker „kandiert") in den Handel gebracht, welches aus Getreidekeimen hergestellt ist.

Es erschien von Interesse, zur weiteren Klärung des Nährwerts der Keime Untersuchungen über deren Vitamingehalt anzustellen.

---

[1]) Landw. Versuchsst. **103**, 259, 1925.

[2]) Zeitschr. f. Tierzüchtung, Züchtungsbiol. und Tierernährung **3**. 343, 1925.

[3]) Journ. of biol. Chem. **25**, 105, 1916.



In dieser Richtung sind bisher nur Weizen und Mais, und zwar im Auslande, untersucht worden. Über die in Deutschland gebauten Cerealien liegen noch keine Untersuchungen vor. Es war dadurch gegeben, unsere Brotgetreidearten, Weizen und Roggen, zu untersuchen. Gleichzeitig erschien es interessant, das erwähnte Präparat Materna vergleichsweise heranzuziehen.

Bezüglich des *Vitamins A* ist bekannt, daß es in den Getreidekörnern nur sehr spärlich vorkommt. Es spricht vieles dafür, daß diese geringen Mengen von Vitamin A wesentlich im Keime zu suchen sind. In der Tat haben *Mc Collum*, *Simmonds* und *Pitz* in Weizenkeimen merkliche Vitamin-A-Mengen gefunden. Was das *Vitamin B* anlangt, so liegen mehrere Untersuchungen vor, nach denen *Chick* und *Hume*[1]), *Osborne* und *Mendel*[2]), sowie *Mc Collum*, *Simmonds* und *Pitz* übereinstimmend einen reichlichen Vitamin-B-Gehalt nachwiesen. Über Roggenkeime konnten wir keine Angaben finden. *Vitamin C* dürfte in den Keimen nicht vorhanden sein. Getreidekörner enthalten dieses Vitamin nicht, und Untersuchungen über Weizenkeime[3]) haben ein negatives Ergebnis gehabt.

Allgemeine Methodik.

Die Prüfung auf Vitamin A und B erfolgte durchweg an weißen Ratten, die im Alter von 3 bis 4 Wochen bei einem durchschnittlichen Gewicht von etwa 50 g in Einzelkäfigen mit der Versuchsnahrung gefüttert wurden. Die Einzelkäfige waren Aquariengläser aus Glas, die mit einem Drahteinsatz zum Durchfallen von Harn und Kot und mit einem Drahtdeckel versehen waren. Auf dem Drahteinsatz waren ein Futternäpfchen aus Glas, ein Salbenbüchschen als Wassergefäß und ein kleiner Blumentopfuntersetzer aus Ton als Lagerstatt befestigt. Die Ratten wurden zweimal in der Woche gewogen, die Nahrungsaufnahme wurde gelegentlich durch Stichproben kontrolliert, im übrigen auf sie täglich beim Ergänzen der Nahrung geachtet. Die Ergebnisse der Versuche werden in Kurven dargestellt.

Zur Herstellung der benötigten vitaminfreien Nahrungsgemische wurden deren Bestandteile einer sorgfältigen mehrfachen Extraktion mit Wasser, Alkohol und Äther unterzogen. Als *Eiweiß* verwendeten wir das schon mehrfach beschriebene Gemisch aus drei Teilen Lactalbumin und einem Teil Plasmon oder, als diese Bestandteile verbraucht waren, Casein. Als *Stärke* wurde Kartoffelstärke, als *Fett* gehärtetes Pflanzenfett verwendet. Das *Salzgemisch* wurde nach *Osborne* und *Mendel* hergestellt. Später bedienten wir uns der einfacheren Herstellung wegen des bekannten Gemisches von *McCollum* und *Davis*. Als Träger von Vitamin B wurde der vitamin-A-freien Nahrung Trockenhefe des Einsiedler-Brauhauses zugesetzt, die vorher

---

[1]) Proc. Roy. Soc. London **90**, 44, 1917.
[2]) Journ. of biol. Chem. **37**, 557, 1919.
[3]) Rep. on the Present State of Knowl. of Access. Food Factors (Vitamins) Med. research. Counc. London, II. Aufl., 1924, S. 112.

vitamin-A-frei extrahiert worden war. Als Träger von Vitamin A diente Lebertran.

Die quantitative Zusammensetzung der Nahrung wird bei den einzelnen Versuchen angegeben.

Untersuchung auf Vitamin A.

Vitaminuntersuchungen werden jetzt häufig derart angestellt, daß die zu prüfende Substanz von vornherein in gewissen Prozentsätzen der vitaminfreien Grundnahrung beigemischt wird, um festzustellen, bei welchem Prozentgehalt die Nahrung als vollwertig bezeichnet werden kann.

Versuch 1. Es wurde zunächst nach dieser Methode verfahren, und zwar glaubten wir mit einer ziemlich geringen Beigabe von 5 oder 10 Proz. auskommen zu können.

Die Nahrungszusammensetzung war deshalb folgende:

18,00	Proz.	Eiweiß (Lactalbumin 3 : Plasmon 1),
15,00	„	gehärtetes Pflanzenfett,
5,00	„	Trockenhefe,
5,00	„	Keime (Weizen- oder Roggenkeime oder Materna),
6,14	„	Salzgemisch (*Osborne* und *Mendel*),
50,86	„	Stärke.

In der zweiten Reihe wurden 10 Proz. der Keime zugegeben und dafür die Stärkemenge auf 45,86 Proz. erniedrigt.

Diese Gemische wurden den Tieren vom ersten Tage des Versuchs ab vorgelegt. Die Ergebnisse sind in Abb. 1 dargestellt, die die Wachstumskurven von je vier Ratten für eine Versuchskost wiedergibt. Auf der Abszisse ist die Versuchsdauer in Abschnitten von je 10 Tagen, auf der Ordinate das Gewicht in 10 g-Abschnitten aufgetragen.

Der Verlauf der Kurven zeigte, daß weder eine Kost, die 5 Proz. Weizenkeime, Roggenkeime oder Materna, noch eine solche, die 10 Proz. dieser Produkte enthielt, richtiges Wachstum junger Ratten auf die Dauer unterhalten konnte. Geringe Unterschiede zwischen den 5 und 10 Proz. Nahrung waren zugunsten der letzteren vorhanden. Im allgemeinen stockte das Wachstum nach anfänglichem raschen Verlauf bereits nach 15 bis 20 Tagen. Ein deutlicher Unterschied zwischen den einzelnen Produkten bestand nicht. Der Versuch wurde deshalb am 36. Tage abgebrochen und nur je ein Tier von jeder Gruppe im Versuch belassen. Dieses diente zur Führung des Beweises, daß die Wachstumsstockung tatsächlich auf Vitamin-A-Mangel zurückzuführen war. Diese Tiere, Nr. 569, 563, 555 und 576, 566, 557, erhielten vom 35. Versuchstage ab (bei + der Abb. 1) eine Zulage von Lebertran, und zwar wurden der Einfachheit halber davon 5 Proz. der Versuchsnahrung beigemischt. Die Abbildung zeigt, daß daraufhin das Wachstum

sogleich energisch von neuem einsetzte, es *hatte also tatsächlich Vitamin-A-Mangel bestanden.*

Der Versuch hat kein positives Ergebnis gehabt, die Zulagen waren zu gering. Sie hätten erhöht werden müssen. Dann aber müssen

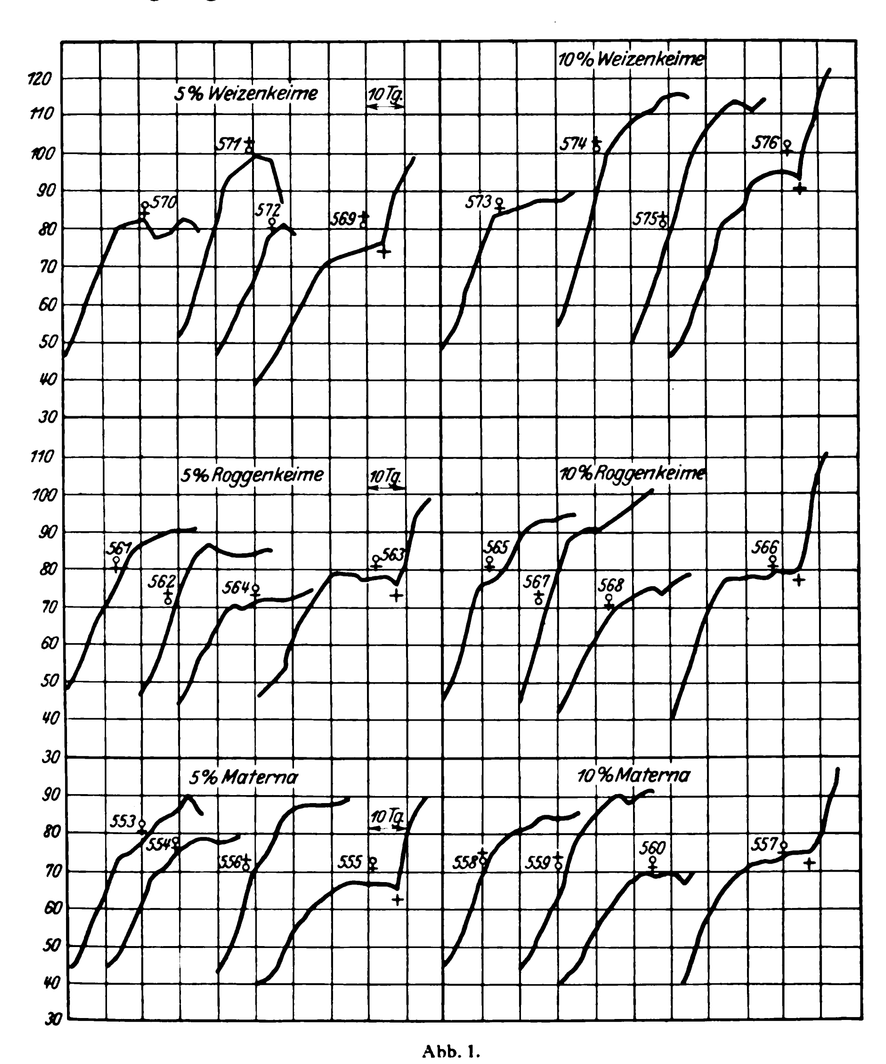


Abb. 1.

erhöhte methodische Bedenken geltend gemacht werden. Die Keimlinge sind derart eiweißreich, daß jedwede erhebliche Zulage die Eiweißversorgung der Versuchstiere ändert. Diese ist aber zweifellos für das Wachstum von Wichtigkeit, es hätte also der Eiweißgehalt der Rationen

auf gleiche Höhe gebracht werden müssen. Dann aber wäre in jeder Ration das Eiweißgemisch immer noch verschieden gewesen. Ferner hat man bei dieser Versuchsanordnung keinerlei Maß für die wirklich aufgenommene Menge des zu prüfenden Materials. Diese ist ganz ins Belieben der Versuchstiere gestellt.

Es wurde deshalb diese Methode verlassen und zu jener zurückgekehrt, die darin besteht, daß zunächst durch eine das betreffende Vitamin nicht enthaltende Kost die Mangelerscheinungen hervorgerufen werden und nunmehr eine Zulage von der zu prüfenden Substanz erfolgt.

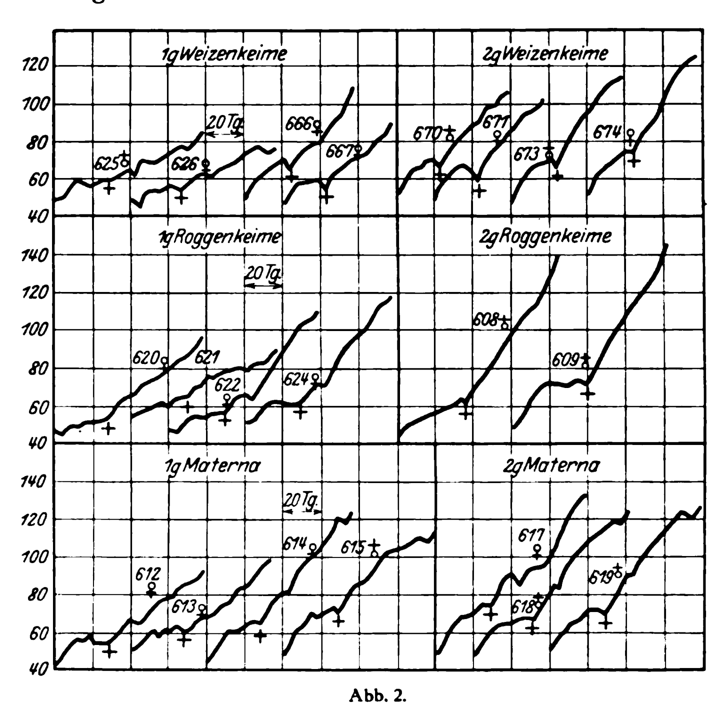


Abb. 2.

Versuch 2. Die Ratten erhielten eine vitamin-A-freie Grundnahrung; diese bestand aus 18 Proz. Casein, 15 Proz. gehärtetem Pflanzenfett, 5 Proz. Salzgemisch (*McCollum*), 5 Proz. Trockenhefe, 57 Proz. Stärke. Sie wuchsen mit dieser Nahrung noch eine kurze Zeit und stellten dann weiteres Wachstum ein. Die Versuchsergebnisse sind in Abb. 2 kurvenmäßig wiedergegeben worden, wobei aber der zeitliche Verlauf in 20tägigen Abschnitten und die Gewichte von 20 zu 20 g angegeben sind. Sobald weiteres Wachstum etwa 14 Tage unterblieben war (Zeichen + in Abb. 2), erfolgte die Zulage von 1 bzw. 2 g der genannten Produkte (Weizenkeime, Roggenkeime, Materna).

Die Kurven zeigen, daß durch diese Zulagen sofort das Wachstum wieder in Gang kam. Weiter sieht man aber, daß keine der drei Produkte in Menge von 1 g ein befriedigendes Wachstum zu sichern vermochte. Die Gewichtszunahmen erfolgten vielmehr langsam, schleppend und mit Stockungen und Rückschlägen. Trotzdem aber zeigte das durch die Zulage langsam in Gang kommende Wachstum, daß Vitamin A in deutlich wirksamer Menge vorhanden war. Die Zulage von 2 g hatte wesentlich besser gewirkt, und zwar waren, wie der steile Anstieg der Kurven zeigt, die *Roggenkeime sowohl den Weizenkeimen als auch dem Produkt Materna etwas* überlegen. Leider waren die Ratten 610 und 611 sowohl wie 616 vor Gabe der Zulage gestorben. Bei den Maternazulagen ist zu berücksichtigen, daß diese von den Ratten schlecht gefressen wurde, so daß manchmal Reste blieben. Dies wirkte sich in dem zackigen Verlauf der Kurven aus. Zweifellos hatten die Weizenkeime aber den geringsten Vitamin-A-Gehalt. Der Versuch führte dann insgesamt zu einem klaren Ergebnis: Weizenkeime, Roggenkeime und das Nährmittel Materna besitzen einen deutlichen, wenn auch nicht sehr hohen Gehalt an Vitamin A.

Untersuchung auf Vitamin B.

Es wurde hierzu ebenfalls in der Weise vorgegangen, daß Ratten auf vitamin-B-freier Kost bis zum Eintreten der Mangelerscheinungen (Wachstumsstillstand, Gewichtsrückgang, struppiges Aussehen) gehalten und ihnen dann die zu prüfenden Produkte zugelegt wurden. Die Wachstumskurven, die ebenso eingerichtet sind, wie in Abb. 2, werden in Abb. 3 gegeben. Die Kost bestand aus 20 Proz. Casein. 10 Proz. gehärtetem Pflanzenfett, 5 Proz. Lebertran, 6,14 Proz. Salzgemisch (*Osborne* und *Mendel*), 58,86 Proz. Stärke. Die Versuchstiere nahmen mit dieser Kost nur ganz kurze Zeit und vorübergehend zu. Nachdem sie etwa 14 Tage keine Gewichtszunahme mehr gezeigt hatten, erfolgte die Zulage (bei + in Abb. 4), und zwar täglich 0,5 g oder 1 g Weizenkeime, Roggenkeime oder Materna. Von letzterem Produkt wurde hierbei eine mit Zucker zur Geschmacksverbesserung versetzte kandierte Materna verwendet.

Der Verlauf der Wachstumskurven zeigt, daß die Zulagen in Höhe von 0,5 g nicht genügten, um normales Wachstum herbeizuführen. Das Wachstum kam mit diesen Zulagen zwar in Gang, war aber noch schleppend. Die Zulagen von 1 g brachten bei Roggenkeimen einen vollen Erfolg. 1 g Materna kandiert war den Keimen etwas unterlegen, wobei aber zu berücksichtigen ist, daß infolge des Zuckergehalts 1 g Materna kandiert nur etwa 0,75 g Materna unkandiert entsprachen. Weiter deuten aber die mit 0,5 g Zulage erzielten Kurven an, daß ebenso wie es bezüglich Vitamin A gefunden wurde, die *Roggenkeime den*

Weizenkeimen um ein geringes überlegen sind. Insgesamt zeigt der Versuch deutlich, daß der Gehalt an Vitamin B sowohl in Weizenkeimen und dem Produkt Materna recht beträchtlich ist, und bestätigt damit die bezüglich der Weizenkeime von den amerikanischen Autoren erhobenen Befunde.

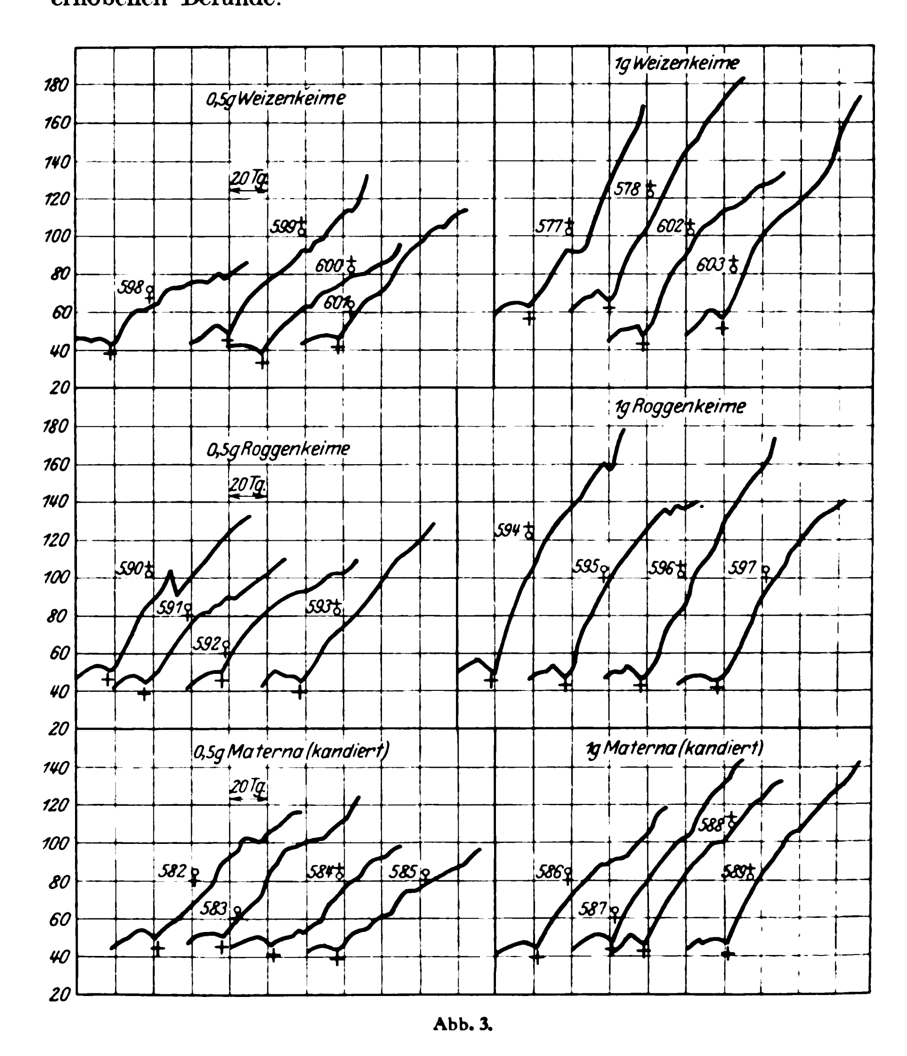


Abb. 3.

Prüfung auf Vitamin C.

Wie schon in der Einleitung erwähnt, ist ein Vitamin-C-Gehalt der Keimlinge unwahrscheinlich. Einige Versuche, die zur Sicherheit mit Meerschweinchen angestellt wurden, brachten hierfür auch bezüglich

der Roggenkeime eine volle Bestätigung. Abb. 4 bringt die Gewichtskurven der Meerschweinchen, die auf Hafer + autoklavierter Milch als Skorbutkost in Einzelkäfigen gehalten wurden und vom ersten Versuchstage an 20 g Keime als Zulage erhielten. Sehr bald traten Gewichtsstillstand und Abnahme ein. Mit Ausbildung der klinischen Skorbutsymptome wurde der Versuch eingestellt.

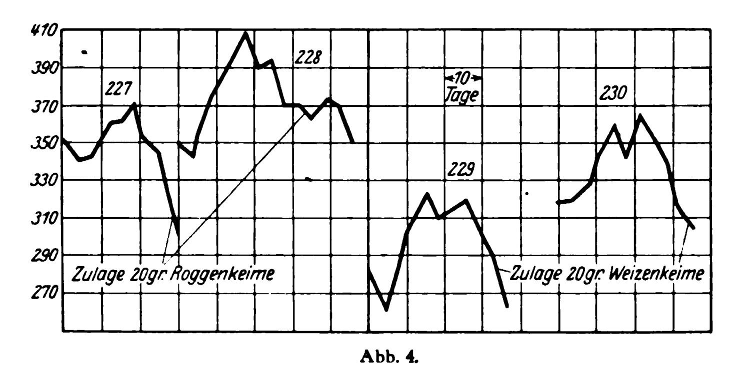


Abb. 4.

Zusammenfassung.

1. Roggenkeime und Weizenkeime enthalten deutliche Mengen von Vitamin A. Der Gehalt ist nicht hoch aber auch nicht unbeträchtlich und in den Roggenkeimen scheinbar um ein geringes höher.

2. Roggenkeime und Weizenkeime enthalten erhebliche Mengen von Vitamin B, und zwar scheinen die Roggenkeime ein wenig überlegen zu sein.

3. Das aus Roggenkeimen hergestellte Produkt Materna enthält Vitamin A und B etwa in dem Ausmaß der Roggenkeime.

4. Vitamin C ist in Roggenkeimen und Weizenkeimen nicht enthalten.

Untersuchung über Autolyse. VI[1]).

Von

P. Rona und **E. Mislowitzer.**

(Aus der Chemischen Abteilung des Pathologischen Instituts der Universität Berlin, Charité.)

(Eingegangen am 12. Januar 1927.)

I.

In einer früheren Mitteilung[2]) wurde über die Zunahme des anorganischen Phosphors während der Autolyse von Kaninchenlebern namentlich in ihrer Abhängigkeit von der Reaktion des Mediums berichtet. In diesen Untersuchungen, die nur spätere Stadien der Autolyse (von der dritten Stunde an bis zu 24 und 48 Stunden) berücksichtigt haben, konnte unabhängig von dem Eiweiß- und Glykogenabbau eine starke Vermehrung des anorganischen Phosphors nachgewiesen werden, die im wesentlichen auf fermentative Spaltung der Nucleine und der Phosphatide zurückgeführt werden mußte. In vielen Fällen wurde jedoch zu Beginn der Autolyse die Menge der säurehydrolysierbaren Phosphorverbindungen größer gefunden als die direkt fällbare Phosphormenge. Dieser Umstand führte uns dazu, den phosphorentbindenden Vorgängen im Beginn und in den ersten Stunden der Autolyse größere Aufmerksamkeit zu schenken[3]) und zu versuchen, den vorhandenen „Phosphor" in mehrere Fraktionen zu zerlegen. Zu diesem Zweck wurde der „nichtkolloidale" Phosphor von dem „kolloidalen" durch Sublimatfällung getrennt und der nicht kolloidale seinerseits in einen nicht spaltbaren und in einen durch Säure nur unter Druck spaltbaren Teil zerlegt. Dazu kamen dann die schon aus der vorigen Mitteilung bekannten Fraktionen: der direkt fällbare, anorganische Phosphor und der durch kurze Säurehydrolyse spaltbare Phosphatester.

[1]) Diese Arbeit wurde mit Unterstützung der Notgemeinschaft der Deutschen Wissenschaft ausgeführt.

[2]) *P. Rona, E. Mislowitzer* und *S. Seidenberg*, diese Zeitschr. **162**, 87, 1925.

[3]) Vgl. über diesen Punkt die inzwischen erschienene Mitteilung von *O. Riesser*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **161**, 149, 1926.

Der allgemeine Gang der Untersuchung war so, daß in einem aliquoten Teil der Lebersuspension (es wurden stets Kaninchen benutzt) nach Veraschung mit dem *Neumann*schen Säuregemisch die Menge des Gesamtphosphats festgestellt wurde. Sämtliche Phosphorbestimmungen sind nach der *Embden*schen Methode durchgeführt. Dann wurde die Suspension nach *Schenck* enteiweißt, in einem aliquoten Teil des Filtrats der direkt fällbare Phosphor bestimmt (Fraktion I). Ein anderer Teil des eiweißfreien Filtrats wurde 4 Stunden lang im siedenden Wasserbad am Rückflußkühler mit 4proz. Salzsäure hydrolysiert, nach der Hydrolyse neutralisiert, das Phosphat wie oben bestimmt (Fraktion II). Ein weiterer Teil des eiweißfreien Filtrats wurde 6 Stunden lang mit 2proz. Salzsäure bei 2½ Atmosphären im Autoklaven erhitzt, dann neutralisiert, das Phosphat wie oben gefällt (Fraktion III). Im letzten Teil des Filtrats wurde nach Veraschung mit dem *Neumann*schen Säuregemisch und Neutralisierung der Gesamtphosphor des eiweißfreien Filtrats bestimmt.

Untersucht man unter diesen Gesichtspunkten den im Moment des Todes vorhandenen Phosphor in der Leber, so findet man folgendes:

In dem Versuch 1 (vgl. Protokoll S. 132) war die Verteilung der einzelnen Fraktionen, ausgedrückt in Prozenten des Gesamtphosphors, zu Beginn des Versuchs

Fraktion	I	9,84
,,	II	12,49
,,	III	17,25
,,	IV	11,06

Auf den kolloidalen (durch Sublimat fällbaren) Teil entfallen demnach fast 50 Proz. (49,36 Proz.) des gesamten Phosphors. Die übrigen 50 Proz. verteilen sich auf die vier Fraktionen, wobei besonders bemerkenswert die ,,Autoklavenfraktion" (Fraktion III) ist, die wesentlich größer ist als die Fraktion der leicht spaltbaren Ester (Fraktion II). Darüber hinaus ist ein nicht unbeträchtlicher Teil des Phosphors nachgewiesen der in so fester organischer Bindung vorhanden ist, daß er auch durch die Autoklavenbehandlung nicht freigelegt werden kann (Fraktion IV).

In dem *Versuch 2* (siehe Protokoll S. 132) war die Verteilung in Prozenten des Gesamtphosphors.

Fraktion	I	11,20
,,	II	13,52
,,	III	24,97
,,	IV	22,32

Die Fraktionen des anorganischen und des leicht hydrolysierbaren Phosphors (I und II) sind nur unwesentlich von denen des ersten Versuchs verschieden. Weit größer sind jedoch die beiden anderen Fraktionen des nicht kolloidalen Phosphors, so vor allem der schwer spaltbare Phosphatester, der ein Viertel des ganzen Leberphosphors ausmacht, und der fast ebenso große nichtkolloidale, organisch

festgebundene Phosphor. Die Vermehrung dieser beiden Fraktionen ist anscheinend auf Kosten des kolloidalen Phosphors erfolgt, der gegenüber dem Versuch 1 ungefähr gerade ebensoviel kleiner ist als die beiden Fraktionen zusammen größer sind.

In den folgenden Versuchen sollten die Veränderungen der unmittelbar nach der Organentnahme gefundenen Phosphorfraktionen während einer kurzdauernden Autolyse festgestellt werden.

Die Anfangswerte der Fraktionen im *Versuch 3* (siehe Protokoll 3, S. 132) decken sich fast vollständig mit den Anfangswerten des ersten Versuchs. In Prozenten des Gesamtphosphors fand man:

Fraktion I	9,04
„ II	10,88
„ III	20,02
„ IV	13,24

Also wieder ungefähr die Hälfte (46,82 Proz.) kolloidaler Phosphor, die zweite Hälfte aufgeteilt auf die vier Fraktionen des nicht kolloidalen Phosphors mit besonders hohem Autoklavenwert. Dieser ist auch im Versuch 2 erkennbar, der ja sonst eine etwas andere Verteilung zeigt. Wir sehen also in der Leber ursprünglich rund 10 Proz. anorganischen Phosphor, rund 10 Proz. leicht hydrolysierbaren Phosphorester, rund 50 Proz. kolloidalen Phosphor und von den noch übrigbleibenden 30 Proz. nicht kolloidalen Phosphors 20 Proz. schwer hydrolysierbaren und 10 Proz. auch unter Druck mit Säure nicht hydrolysierbaren Phosphor. Diese Verteilung wird nun bei der Autolyse verschoben. Es werden zwei parallel verlaufende Autolysen, eine bei p_H 6,1, die andere bei p_H 8,2 angesetzt. In beiden Reihen konnte bei der Entnahme 1 und 2 Stunden nach Beginn des Versuchs ein Anwachsen der niedrigen Phosphorkomplexe auf Kosten der höheren beobachtet werden. Folgende Verteilung in Prozenten des Gesamtphosphors wurde gefunden:

	In dem Versuch bei p_H 6,12	In dem Versuch bei p_H 8,23
1. Entnahme nach 1 Stunde		
Fraktion I	10,93	15,31
„ II	9,43	12,86
„ III	23,25	22,30
„ IV	20,43	19,23
Kolloid. Phosphor . .	35,96	31,18
2. Entnahme nach 3 Stunden.		
Fraktion I	16,26	18,03
„ II	20,51	26,08
„ III	20,08	16,10
„ IV	12,94	17,13
Kolloid. Phosphor . .	30,22	22,66

Der kolloidale Teil hat in diesem Versuch bei p_H 6,1 schon in einer Stunde eine Abnahme von 10 Proz. (von 47 auf 36 Proz.) des Gesamtphosphors erfahren, nach weiteren 2 Stunden beträgt er nicht mehr ganz zwei Drittel des ursprünglichen kolloidalen Phosphors. In dem Versuch bei p_H 8,2 ist dieser letztere Wert schon nach 1 Stunde erreicht, während nach 3 Stunden der übrigbleibende kolloidale Phosphor nur noch etwas weniger als die Hälfte des ursprünglich vorhandenen beträgt. Es sind also intensive Spaltungsvorgänge in den kolloidalen phosphorhaltigen Substanzen vor sich gegangen, die in 3 Stunden die Hälfte der Gesamtmenge betrafen. Eine Abhängigkeit von dem p_H ist unverkennbar, da die Spaltung bei 8,2 erheblich schneller verlief als bei 6,1.

Was die Verhältnisse der anorganischen Phosphatfraktion anlangt, so ist der Anfangswert von 9 Proz. (bei p_H 6,1) in 1 Stunde nur um 1,9 Proz. angewachsen, während in derselben Zeit der kolloidale Phosphor um 11 Proz., also um das Sechsfache abgenommen hat. Der Phosphor wird also bei der Spaltung der kolloidalen Phosphoranteile zunächst nicht anorganisch. Aus dem Vergleich der anderen drei Fraktionen des nicht kolloidalen Phosphors ist ersichtlich, daß der Zuwachs der Autoklavenportion und der der nicht hydrolysierbaren Fraktion sich gerade mit der Abnahme des kolloidalen Phosphors deckt. Die phosphorhaltigen kolloidalen Substanzen sind hier zum größten Teile nur so weit aufgespalten, daß sie nicht mehr kolloidal sind; eine leicht hydrolysierbare Phosphoresterbindung tritt noch nicht auf. Wenn doch Ester vorliegen, so sind diese noch zu größeren Molekülkomplexen verbunden, die auch durch Säurehydrolyse im Autoklaven zum größten Teile nicht spaltbar sind. Es ergibt sich also: Spaltung des kolloidalen Phosphors zu nicht kolloidalen, gar nicht oder äußerst schwer säurespaltbaren Verbindungen.

Die zweite Abnahme in demselben Versuch ist auch sehr lehrreich. Die Abnahme des kolloidalen Phosphors ist weitergegangen. Jetzt sind aber auch die beiden Fraktionen III und IV vermindert, die zuerst ihr Material bei der Spaltung des kolloidalen Phosphors beziehen. Wir müssen die Abnahme dieser beiden Fraktionen um so höher bewerten, als sie ja auch noch die Abnahme des kolloidalen Anteils in sich schließt. Alle drei kleiner gewordenen Fraktionen haben ihr Material an die nächsten beiden (I und II) weitergeliefert, wie deren sehr starkes Anwachsen zeigt.

Bei dem Versuch bei p_H 8,2 ist die Aufspaltung des Phosphors von der kolloidalen Form über alle Zwischenstufen, bis herunter zur anorganischen, etwas stürmischer. Prinzipiell ist der Verlauf bei der einstündigen Autolyse in diesem Versuch der gleiche wie in dem Versuch bei 6,1, nur ist die Endaufspaltung etwas größer. Die dreistündige

Abnahme zeigt eindeutig, wie stark der anorganische und der leicht hydrolysierbare Phosphor auf Kosten des fester gebundenen zugenommen hat; während die beiden untersten Fraktionen zu Beginn des Versuchs nur 19,9 Proz. des Gesamtphosphors ausmachen, haben sie hier nach 3 Stunden den Wert von 44,1 Proz. erreicht. Ob ein Teil des anorganischen Phosphors nicht während der Autolyse noch nachträglich verestert worden ist, läßt sich nicht mit Sicherheit entscheiden. doch ist es unwahrscheinlich.

Ein zweiter Versuch (Versuch 4, Protokoll S. 133) bei p_H 4,58 und 6,82 ausgeführt, zeigt genau dasselbe Bild. Die Verteilung der einzelnen Fraktionen (in Prozenten des Gesamtphosphors) zeigt die folgende Tabelle.

Zu Beginn war die Verteilung wie folgt:

Fraktion I	12,20
„ II	14,35
„ III	19,32
„ IV	24,90
Kolloid. Phosphor	29,23

Im Verlauf der Autolyse wurde folgende Verteilung gefunden:

	In dem Versuch bei p_H 4,58	In dem Versuch bei p_H 6,82
1. Entnahme nach 1 Stunde.		
Fraktion I	18,09	19,35
„ II	9,50$_9$	12,17
„ III	20,85	27,59
„ IV	25,93	15,57
Kolloid. Phosphor	25,57	25,33
2. Entnahme nach 3 Stunden.		
Fraktion I	19,74	26,58
„ II	16,31	20,16
„ III	21,32	16,98
„ IV	18,92	12,90
Kolloid. Phosphor	23,61	23,39

Die Autolyse ist in diesem Versuch etwas langsamer verlaufen als in dem vorherigen; ein Unterschied in dem Gesamtverlauf, gemessen an der Abnahme des kolloidalen Phosphors, ist bei p_H 4,6 und p_H 6.8 nicht zu bemerken. Jedoch ist die Verschiebung der Fraktionen bei p_H 6.8 viel ausgeprägter als bei p_H 4.6. Diese Verschiebung zeigt nun in den wesentlichen Punkten dieselben Züge wie im Versuch 3: Zunahme der niederen Fraktionen (des anorganischen und des leicht hydrolysierbaren Phosphors) während der Autolyse auf Kosten der höheren. Der kolloidale Phosphor weist bei allen eine Abnahme auf. Was die einzelnen Fraktionen anlangt, so ist nach

1 Stunde im Versuch bei p_H 4,58 in den zwei ersten Fraktionen noch eine leichte Zunahme zu verzeichnen, während im Versuch bei p_H 6,8 Fraktion IV bereits sehr stark (von 24,90 auf 15,57 Proz.) abgenommen hat unter gleichzeitiger, fast entsprechender Zunahme der Fraktion III. Interessant ist die Zunahme des anorganischen Phosphors auf Kosten des leicht hydrolysierbaren in beiden Versuchsreihen. Nach 3 Stunden ist die Vermehrung weiter fortgeschritten. Namentlich deutlich ist dies im Versuch bei p_H 6,82 zu erkennen, wo die Fraktionen III und IV und der kolloidale Teil 20,17 Proz. ab-, die Fraktionen I und II 20,19 Proz. zugenommen haben.

Prinzipiell dieselben Verhältnisse liegen im Versuch 5 (Protokoll S. 133) vor, doch sind infolge der geringfügigen Autolyse die Ausschläge nicht so deutlich.

Zu Beginn war die Verteilung wie folgt:

Fraktion	I	13,49 Proz.
„	II	16,19 „
„	III	9,31 „
„	IV	23,78 „
Kolloid. Phosphor		37,52 Proz.

Im Verlauf der Autolyse wurde folgende Verteilung gefunden:

	In dem Versuch bei p_H 6,08	In dem Versuch bei p_H 8,25
Entnahme nach 3 Stuuden.		
Fraktion I	16,47	18,29
„ II	13,24	15,86
„ III	15,82	12,80
„ IV	21,50	19,77
Kolloid. Phosphor	32,95	33,27

II.

Die bisherigen Untersuchungen haben ergeben, daß während der Autolyse in der Verteilung des Phosphors eine Verschiebung statthat. Die ursprüngliche Verteilung, in der wir einen im Leben vorhandenen Zustand angenähert erblicken können, weist schon, wie oben dargelegt, charakteristische Merkmale auf. Die Verschiebung beruht im wesentlichen darauf, daß der kolloidale Teil über Zwischenstufen zu schwer-, dann zu leicht-spaltbaren Estern und schließlich zum erheblichen Teile zu anorganischem Phosphor überführt wird. Für die leicht spaltbaren Ester ist es am naheliegendsten, ein Mono- oder Disaccharosephosphat anzunehmen. Die nächstfolgenden Versuche haben zur Aufgabe, Anhaltspunkte dafür zu gewinnen, inwieweit man diesen Ester mit diesem Hexosephosphat identifizieren kann und ob bei der leicht

spaltbaren Fraktion eventuell auch andere Esterarten in Frage kommen. Für die schwer spaltbare Form muß man wohl höhere Komplexe annehmen, die unter Autoklavenbehandlung ihr Phosphat anorganisch abgeben. Ihr Verhalten bei der Autolyse ist noch nicht geklärt. Es ist möglich, daß sie durch die Einwirkung der Fermente ebenfalls anorganisches Phosphat abspalten, dieser anorganische Phosphor aber sofort mit der vorhandenen Hexose verestert wird, und daß es dadurch zu der Vermehrung der leicht spaltbaren Fraktion kommt. Oder ist die leicht spaltbare Form (also wohl die Hexoseester) schon in den schwer spaltbaren größeren Komplexen präformiert vorhanden? Die Entscheidung hierüber läßt sich nur nach Isolierung der schwer spaltbaren Komplexe, ihrer Aufspaltung und Bestimmung erbringen. Unsere Untersuchungen erstreckten sich zunächst auf die leicht spaltbare Form.

Die Untersuchung auf Äquivalenz zwischen Hexose- und Phosphatwerten läßt sich ohne weiteres nicht anstellen, da die Reduktionswerte durch die unvermeidliche Anwesenheit gleichzeitig vorhandener Zuckermengen (Spaltung des Glykogens in der Autolyse) in keine Beziehung zu den Phosphatwerten zu setzen sind. Wir haben versucht, die Schwierigkeit dadurch zu beseitigen, daß wir die Glykogenmengen durch Hungernlassen der Tiere möglichst niedrig hielten, ferner den vorhandenen Zucker ganz oder zum Teil vergoren haben. Hierbei darf, wenn der Zucker (auch der Zucker in Form von Hexosephosphat) vergoren wurde und der ganze Phosphatester als „Hexosephosphat" vorliegt, am Schluß kein hydrolysierbarer Ester vorhanden sein. Wurde nach der (nicht vollständigen) Vergärung noch ein Reduktionswert gefunden, so konnte man nachsehen, ob eine stöchiometrische Beziehung zwischen dem noch vorhandenen Reduktionswert (auf Glucose berechnet) und dem Phosphatwert, der nach leichter Hydrolyse gewonnen wird, besteht. Wurde eine Beziehung gefunden, die auf Hexosemono- oder -diphosphorsäure stimmt, so war eine gewisse Berechtigung vorhanden, diese leicht spaltbare Fraktion als Hexosemono- oder -diphosphorsäure anzusehen. Wurde nach der leichten Hydrolyse mehr Phosphat gefunden als dem Reduktionswert entsprechen konnte, so hätte man Anhaltspunkte für die Annahme anderer Ester. Das Nicht-Auftreten von anderen als Hexoseestern spricht jedoch nicht mit voller Sicherheit gegen die ursprüngliche Anwesenheit solcher Verbindungen, da sie möglicherweise bei der Hefebehandlung fermentativ gespalten und sich so dem Nachweis als Ester entziehen konnten. Entscheidender sind natürlich positive Befunde, da diese nicht anders zu deuten sind, als durch die Anwesenheit nicht vergärbarer und nicht reduzierender Ester.

Der allgemeine Gang der Untersuchungen war der folgende.

Ein Teil der Lebersuspension wurde mit kolloidalem Eisenhydroxyd enteiweißt, mit Quecksilberacetat behandelt und nach *Bertrand* der Re-



duktionswert bestimmt. Ein weiterer Teil der Suspension wurde nach *Schenck* enteiweißt, dann mit Hefe versetzt, nach der Vergärung mit Sublimat, dann mit Quecksilberacetat behandelt, und in aliquoten Teilen der Reduktionswert nach *Bertrand* und die einzelnen Phosphorfraktionen (direkte, leicht hydrolysierbare, schwer — im Autoklaven — hydrolysierbare und nicht hydrolysierbare Fraktion) bestimmt.

Die einzelnen Versuche ergaben folgendes:

Versuch 11 (vgl. Protokoll S. 133).

Phosphatwerte nach der Hefebehandlung:

Fraktion	I	106,0 mg	P_2O_5
„	II	141,66 „	P_2O_5
„	III	195,8 „	P_2O_5
„	IV	210,2 „	P_2O_5

Zuckerwerte: Vor der Hefebehandlung 252 mg, nach der Hefebehandlung 91 mg.

Es kommen 0,508 Millimol Phosphorsäure auf 0,505 Millimol Zucker.

Versuch 12 (vgl. Protokoll S. 133).

Phosphatwerte nach der Hefebehandlung:

Fraktion	I	129,5 mg	P_2O_5
„	II	170,8 „	P_2O_5
„	III	232,0 „	P_2O_5
„	IV	246,6 „	P_2O_5

Zuckerwerte: Vor der Hefebehandlung 450 mg, nach der Hefebehandlung 105 mg.

Es kommen 0,582 Millimol Phosphorsäure auf 0,583 Millimol Zucker.

Versuch 13 (vgl. Protokoll S. 134).

Phosphorwerte nach der Hefebehandlung:

Fraktion	I	229,05 mg	P_2O_5
„	II	253,57 „	P_2O_5
„	III	307,2 „	P_2O_5
„	IV	319,7 „	P_2O_5

Zuckerwerte: Vor der Hefebehandlung 426 mg, nach der Hefebehandlung 13,44 mg.

Es kommen 0,344 Millimol Phosphorsäure auf 0,075 Millimol Zucker.

Versuch 14 (vgl. Protokoll S. 134).

Phosphorwerte nach der Hefebehandlung:

Fraktion	I	291,41 mg	P_2O_5
„	II	330,93 „	P_2O_5
„	III	398,1 „	P_2O_5
„	IV	399,3 „	P_2O_5

Zuckerwerte: Vor der Hefebehandlung 376 mg, nach der Hefebehandlung 44,4 mg.

Es kommen 0,552 Millimol Phosphorsäure auf 0,246 Millimol Zucker.

Versuch 15 (vgl. Protokoll S. 134).

Phosphorwerte nach der Hefebehandlung:

Fraktion I	238,5 mg	P_2O_5
„ II	283,2 „	P_2O_5
„ III	312,4 „	P_2O_5
„ IV	319,0 „	P_2O_5

Zuckerwerte: Vor der Hefebehandlung 534 mg, nach der Hefebehandlung 150 mg.

Es kommen 0,70 Millimol Phosphorsäure auf 83 Millimol Zucker.

Versuch 16 (vgl. Protokoll S. 134).

Phosphorwerte nach der Hefebehandlung:

Fraktion I	175,18 mg	P_2O_5
„ II	205,8 „	P_2O_5
„ III	238,12 „	P_2O_5
„ IV	261,14 „	P_2O_5

Zuckerwerte: Vor der Hefebehandlung 378 mg, nach der Hefebehandlung 37,24 mg.

Es kommen 0,430 Millimol Phosphorsäure auf 0,21 Millimol Zucker.

Versuch 17 (vgl. Protokoll S. 134).

Phosphorwerte nach der Hefebehandlung:

Fraktion I	180,32 mg	P_2O_5
„ II	209,28 „	P_2O_5
„ III	245,6 „	P_2O_5
„ IV	267,28 „	P_2O_5

Zuckerwerte: Vor der Hefebehandlung 414,0 mg, nach der Hefebehandlung 25,20 mg.

Es kommen 0,406 Millimol Phosphorsäure auf 0,140 Millimol Zucker.

Versuch 20 (vgl. Protokoll S. 134).

Phosphorwerte nach der Hefebehandlung:

Fraktion I	127,76 mg	P_2O_5
„ II	133,36 „	P_2O_5
„ III	178,64 „	P_2O_5
„ IV	185,2 „	P_2O_5

Zuckerwerte: Vor der Hefebehandlung 366 mg, nach der Hefebehandlung keine Reduktion.

Der direkt fällbare Phosphor nimmt (so gut wie) nicht zu nach der Hydrolyse.

Versuch 21 (vgl. Protokoll S. 134).

Phosphorwerte nach der Hefebehandlung:

Fraktion	I	125,34 mg	P_2O_5
„	II	138,88 „	P_2O_5
„	III	210,88 „	P_2O_5
„	IV	233,28 „	P_2O_5

Zuckerwerte: Vor der Hefebehandlung 492 mg, nach der Hefebehandlung keine Reduktion.

Der direkt fällbare Phosphor nimmt (fast) nicht zu nach der Hydrolyse.

Wie aus den Versuchen ersichtlich ist, gelang in einigen Fällen eine völlige Vergärung, d. h. nach der Vergärung war keine Reduktion vorhanden. In anderen Fällen blieb jedoch eine mehr oder weniger starke Reduktion übrig. Wo keine Reduktion mehr gefunden wurde (Versuche 20, 21), war auch (fast) kein leicht hydrolysierbarer Phosphatester mehr vorhanden. Die Wägungsdifferenz an P_2O_5 vor und nach der Hydrolyse beträgt absolut nur 3 bis 4 mg, d. h. nur etwa 5 Proz. der gewogenen Menge. Wollen wir diese Summe als außerhalb der Fehler betrachten, so müssen wir sie auf nicht reduzierende, nicht vergärbare Ester beziehen.

Hierfür sprechen die Ergebnisse der Versuche 13 und 17 (und vielleicht auch 14), wo der leicht hydrolysierbare Phosphatwert größer ist als selbst der Äquivalenz eines Diphosphats entspricht. Die meisten anderen Versuche, 15, 16, 11 und 12, zeigen eine genaue Äquivalenz, wie sie einem Hexosemono- bzw. einem Hexosediphosphat entspricht. Die leicht spaltbare Esterfraktion besteht also wahrscheinlich zum größten Teile aus dieser Verbindung. Hierüber sind noch weitere Untersuchungen im Gange[1]).

Zusammenfassung.

1. Der im Leberbrei unmittelbar nach dem Tode gefundene Phosphor kann in mehrere Fraktionen zerlegt werden: in einen kolloidalen und einen nicht kolloidalen Teil, und der letztere weiterhin — außer dem direkt fällbaren anorganischen Phosphor — in einen leicht, in einen schwer (nur im Autoklaven) hydrolysierbaren und in einen überhaupt nicht spaltbaren Teil.

[1]) Vgl. hierzu *O. Riesser* l. c., ferner *E. Schmitz*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **144**, 196, 1925.

2. Während der Autolyse erleidet die Verteilung dieser Fraktionen eine Verschiebung, die im wesentlichen darauf beruht, daß der kolloidale Teil über Zwischenstufen zu schwer, dann zu leicht spaltbaren Estern, schließlich zum erheblichen Teil zu anorganischem Phosphor überführt wird.

3. Die durch Säure leicht hydrolysierbare Fraktion besteht anscheinend im wesentlichen aus Hexosedi- bzw. -monophosphorsäure. Außerdem ist jedoch wahrscheinlich noch ein nicht reduzierender und nicht gärender Phosphatester darin vorhanden.

Auszug aus den Protokollen.

Versuch 1. 38 g Kaninchenleber + 100 ccm destilliertes Wasser. Zweimal 25 ccm nach *Schenck* enteiweißt auf 200 ccm aufgefüllt.

I. *Direkte Phosphatfällung.* In 60 ccm des eiweißfreien Filtrats gefunden 1,603 mg P_2O_5. Auf 100 g Leber berechnet 77,62 mg P_2O_5. — II. *Phosphatfällung nach der Hydrolyse.* 50 ccm vom eiweißfreien Filtrat in 4 Proz. HCl 4 Stunden am Wasserbad hydrolysiert, dann neutralisiert, auf 100 ccm aufgefüllt, in 50 ccm P gefällt. Gefunden 1,515 mg P_2O_5. Auf 100 g Leber 176,06 mg P_2O_5. — III. *Phosphatfällung nach Erhitzen im Autoklaven.* 50 ccm des enteiweißten Filtrats wurden mit 2proz. HCl 6 Stunden bei 2½ Atmosphärendruck im Autoklaven erhitzt, neutralisiert, auf 100 ccm aufgefüllt, 50 ccm nach *Embden* behandelt. Gefunden 2,685 mg P_2O_5, auf 100 g Leber 311,9 mg. — IV. *Gesamtphosphor im eiweißfreien Filtrat.* 25 ccm des eiweißfreien Filtrats mit *Neumann*schen Säuregemisch verascht, neutralisiert, auf 50 ccm aufgefüllt, davon 20 ccm gefällt. Gefunden 1,374 mg P_2O_5, auf 100 g Leber 399,1 mg. — V. *Gesamtphosphor.* Zweimal 5 ccm der Lebersuspension wurden nach *Neumann* verascht, auf 100 ccm aufgefüllt, davon 10 ccm gefällt. Gefunden 1,085 mg P_2O_5, auf 100 g Leber 788,1 mg.

Versuch 2. 54,9 g Kaninchenleber + 120 ccm destilliertes Wasser. — Sonst wie Versuch 1 behandelt. — I. Direkte Phosphatfällung. Gefunden 2,151 mg P_2O_5, auf 100 g Leber 92,39 mg. — II. Phosphatfällung nach Hydrolyse (Fällung in 40 ccm). Gefunden 1,603 mg P_2O_5; auf 100 g Leber 206,55 mg. — III. Phosphatfällung nach Erhitzen im Autoklaven (Fällung in 40 ccm). Gefunden 3,238 mg P_2O_5, auf 100 g Leber 417,28 mg. — IV. Gesamtphosphat im eiweißfreien Filtrat. Gefunden 1,88 mg P_2O_5; auf 100 g Leber 605,68 mg P_2O_5. — V. Gesamtphosphor. Gefunden 1,31 mg P_2O_5; auf 100 g Leber 844,09 mg.

Versuch 3. 55 g Kaninchenleber + 200 ccm destilliertes Wasser. Je 100 ccm von der Suspension 1. zu 100 ccm Acetatgemisch (m/5, p_H 6,12), 2. zu Boratgemisch m/5, p_H 8,23. — I. Direkte Phosphatfällung (60 ccm gefällt). — II. Phosphatfällung nach Hydrolyse. (Vom eiweißfreien Filtrat 50 ccm hydrolysiert, auf 100 ccm aufgefüllt, 60 ccm gefällt.) — III. Phosphatfällung nach Erhitzen im Autoklaven. 50 ccm autoklaviert, auf 100 ccm aufgefüllt, in 60 ccm gefällt. — IV. Gesamtphosphat im eiweißfreien Filtrat. 25 ccm verascht, auf 50 ccm aufgefüllt, in 25 ccm gefällt. — V. Gesamtphosphat. 5 ccm der Suspension verascht, auf 100 ccm aufgefüllt; in 15 ccm gefällt. — Alle Zahlen mg P_2O_5 (in Klammern mg P_2O_5 auf 100 g Leber). Gesamtphosphat: gefunden 1,32 mg P_2O_5; auf 100 g Leber 817,8 mg P_2O_5.

Anfangswert. I. 0,718 (73,96); II. 1,015 (162,90); III. 1,58 (326,62); IV. 0,88 (434,91).

Versuchsreihe bei p_H 6,12. Abnahme nach 1 Stunde. I. 0,87 (89,34); II. 1,03 (166,49); III. 1,73 (356,66); IV. 1,06 (523,69). — Abnahme nach 3 Stunden. (Je 30 ccm enteiweißt, auf 200 ccm aufgefüllt.) I. 1,21 (125,17); II. 1,12 (230,32); III. 2,01 (412,70); IV. 1,14 (562,78).

Versuchsreihe bei p_H 8,23. Abnahme nach 1 Stunde. I. 1,29 (132,92); II. 1,46 (300,66); III. 2,256 (464,85); IV. 1,154 (570,66).

Versuch 4. 69 g Kaninchenleber + 200 ccm destilliertes Wasser. Je 100 ccm von der Suspension 1. zu 100 ccm Lactatgemisch (m/5, p_H 4,58), 2. zu 100 ccm Boratgemisch (m/5, p_H 6,82). — Sonst wie im Versuch 3. — Zahlen Milligramm P_2O_5. Gesamtphosphor: gefunden 1,32 (687,75).

Anfangswert. I. 0,97 (83,94); II. 1,05 (182,65); III. 1,82 (315,52); IV. $1{,}40_5$ (486,79).

Versuchsreihe bei p_H 4,58. — Abnahme nach 1 Stunde: I. 1,44 (124,40); II. 1,09 (189,20); III. 1,94 (333,57); IV. 1,48 (511,91). — Abnahme nach 3 Stunden (30 ccm enteiweißt, auf 200 ccm aufgefüllt). I. 1,57 (135,78); II. 1,43 (247,95); III. 2,28 (394,93); IV. 1,52 (525,02).

Versuchsreihe bei p_H 6,82. Abnahme nach 1 Stunde: I. 1,54 (133,06); II. 1,25 (216,76); III. 2,35 (406,47); IV. 1,48 (513,56). — Abnahme nach 3 Stunden: I. 2,11 (182,81); II. 1,58 (321,44); III. 2,53 (438,21); IV. 1,52 (526,90).

Versuch 5. 75 g Kaninchenleber + 200 ccm destilliertes Wasser. Je 100 ccm von der Suspension 1. zu 100 ccm Acetatgemisch (m/5, p_H 6,08), 2. zu 100 ccm Boratgemisch (m/5, p_H 8,25). Sonst wie im Versuch 2 und 3. Zahlen Milligramm P_2O_5. Gesamtphosphor: gefunden 1,81 (886,36).

Anfangswert. I. 1,47 (119,52); II. 1,62 (263,01); III. 2,10 (343,06); IV. 1,42 (553,82).

Versuchsreihe bei p_H 6,08. Abnahme nach 3 Stunden: I. 1,79 (145,96); II. 1,64 (263,33); III. 1,65 (403,69); IV. 1,52 (594,27).

Versuchsreihe bei p_H 8,25. Abnahme nach 3 Stunden: I. 1,99 (162,14); II. 1,86 (302,69); III. 1,70 (416,18); IV. 1,51 (591,44).

Versuch 11. 90 g Kaninchenleber + 150 ccm. — 25 ccm Suspension mit kolloidalem Eisen enteiweißt, auf 200 ccm aufgefüllt, davon 25 ccm Quecksilberacetat behandelt. — In 75 ccm wurden nach *Bertrand* 252 mg Glucose gefunden. — 75 ccm Suspension wurden nach *Schenck* enteiweißt, mit Hefe vergoren, mit Sublimat und Quecksilberacetat behandelt, auf 500 ccm aufgefüllt („Versuchslösung").

Nach der Hefebehandlung sind in 75 ccm Suspension noch 91 mg Glucose vorhanden.

Phosphorbestimmung. (Zahlen Milligramm P_2O_5. In den Klammern Werte für 75 ccm Suspension.) I. (10 ccm gefällt) 2,12 (106,0). II. (25 ccm in 4proz. HCl im Wasserbad, auf 50 ccm aufgefüllt, davon 20 ccm gefällt) 2,83 (141,66). III. (25 ccm mit 2proz. HCl 6 Stunden bei 2½ Atm., dann auf 100 ccm aufgefüllt, davon 10 ccm gefällt) 0,98 (195,80). IV. (25 ccm verascht, auf 100 ccm aufgefüllt, davon 10 ccm gefällt) 1,05 (210,20).

Versuch 12. 50 g Kaninchenleber + 80 ccm destilliertes Wasser. Wie oben behandelt. Zu 75 ccm Suspension 450 mg Glucose.

75 ccm Suspension wie oben behandelt. Nach der Hefebehandlung noch 105 mg Zucker vorhanden.

Phosphorbestimmung. (Zahlen wie oben.) I. 2,59 (129,50); II. 1,708 (170,8); III. 2,32 (232,0); IV. 1,23 (246,6).

Versuch 13. 65 g Kaninchenleber + 100 ccm destilliertes Wasser. Wie oben behandelt. In 75 ccm der Suspension 426 mg Glucose.

75 ccm Suspension wie oben behandelt. Nach der Hefebehandlung 13,44 mg Glucose.

Phosphorbestimmung (Zahlen wie oben). I. 3,58 (229,06); II. 3,96 (253,57); III. 1,20 (307,2); IV. 1,25 (319,7).

Versuch 14. 60 g Kaninchenleber + 100 ccm destilliertes Wasser. Wie oben behandelt. In 50 ccm der Suspension 376 mg Glucose.

50 ccm Suspension wie oben behandelt. Nach der Hefebehandlung noch 44,4 mg Glucose vorhanden.

Phosphorbestimmung. (Werte in den Klammern auf 50 ccm Suspension.) I. 1,97 (291,41); II. 2,24 (330,93); III. 2,69 (398,1); IV. 1,35 (399,30).

Versuch 15. 43,5 g Kaninchenleber + 80 ccm destilliertes Wasser. Wie oben behandelt. In 75 ccm der Suspension 534 mg Glucose.

In 75 ccm der Suspension nach der Hefebehandlung noch 150 mg Glucose.

Phosphorbestimmung. (Werte in den Klammern auf 75 ccm Suspension). I. 2,38 (238,5); II. 1,44 (288,2); III. 1,56 (312,40); IV. $0{,}79_3$ (319,8).

Versuch 16. 42 g Kaninchenleber + 80 ccm destilliertes Wasser. Wie oben behandelt. In 75 ccm Suspension 378 mg Glucose. Nach der Hefebehandlung in 75 ccm Suspension 37,24 mg.

Phosphorbestimmung (Zahlen wie oben). I. 2,30 (175,18); II. 1,35 ($205{,}80_8$); III. 1,57 (238,12); IV. 1,72 (261,14).

Versuch 17. 44 g Kaninchenleber + 80 ccm destilliertes Wasser. Wie oben behandelt. In 75 ccm Suspension 414,0 mg Glucose; nach der Vergärung 25,20 mg.

Phosphorbestimmung (Zahlen wie oben). I. 2,25 (180,32); II. 1,31 (209,28); III. 1,54 (245,6); IV. 1,60 (267,28).

Versuch 20. 66 g Kaninchenleber + 100 ccm destilliertes Wasser. Wie oben behandelt. In 75 ccm Suspension 366 mg Glucose; nach der Vergärung keine Reduktion.

Phosphorbestimmung (Zahlen wie oben). I. $1{,}59_7$ (127,76); II. $1{,}66_7$ (133,36); III. 178,64; IV. 185,20.

Versuch 21. 65 g Kaninchenleber + 100 ccm destilliertes Wasser. Wie oben behandelt. In 75 ccm Suspension 492 mg Glucose; nach der Vergärung keine Reduktion.

Phosphorbestimmung (Zahlen wie oben). I. 1,57 (125,34); II. 1,64 (130,88); III. 2,64 (210,88); IV. $1{,}45_8$ (233,28).



Der Zustand des Chlorophylls in der lebenden Pflanze.

Von

Kurt Noack.

(Aus dem Botanischen Institut der Universität Erlangen.)

(Eingegangen am 13. Januar 1927.)

Der Chlorophyllfarbstoff ist bekanntlich an besondere Organe des Protoplasmas, an die Chloroplasten, gebunden, die als lebende Zellbestandteile organisiertes Eiweiß besitzen, außerdem regelmäßig Lipoide und neben dem Chlorophyll a und b mindestens zwei weitere Farbstoffe, das Carotin und Xanthophyll, führen[1]). Ein tieferer Einblick in den Bau des Chloroplasten ist bis jetzt nicht gewonnen worden; die allenthalben beschriebenen Inhomogenitäten der Chloroplastenmasse gestatten keine allgemeine Schlußfolgerung, zumal nach den Literaturangaben der wesentliche Bestandteil des normalen Chloroplasten im allgemeinen als optisch homogen betrachtet werden muß. Besonders wichtig ist im Hinblick auf die Photosynthese die Frage nach dem Zustand des Chlorophylls im lebenden Chloroplasten.

Hierbei sind folgende Tatsachen vornehmlich zu berücksichtigen:

In manchen organischen Stoffen löst sich das Chlorophyll molekulardispers und zeigt dabei starke Rotfluoreszenz, während es sich in Wasser kolloidal löst, ohne Fluoreszenz zu zeigen. *Willstätter* und *Stoll* kamen nun, wie schon andere Autoren vor ihnen, auf Grund spektroskopischer Vergleiche zwischen lebenden Blättern und verschiedenen Chlorophyllösungen zu dem Schluß, daß die Chloroplasten den Farbstoff in kolloidalem oder einem diesem sehr ähnlichen Zustande führen[2]). Zu dieser Folgerung wurden die beiden Forscher außerdem durch das Verhalten der Chloroplasten gegen die verschiedenen organischen Lösungsmittel gedrängt. Demgegenüber griff *Stern*[3]) die schon seit langem

[1]) *R. Willstätter* und *A. Stoll*, Untersuchungen über d. Chlorophyll. Berlin 1913.

[2]) *Dieselben*, ebendaselbst, S. 61.

[3]) *K. Stern*, Zeitschr. f. Botanik **13**, 193, 1921.

bekannte Tatsache auf, daß das Chlorophyll im lebenden Blatte stark rot fluoresziert, und kam unter ergänzender Heranziehung von Modellversuchen zu dem Schluß, daß der Farbstoff in den Lipoiden des Chloroplasten molekulardispers gelöst ist, und zwar so, daß der Chloroplast „ein Emulsionskolloid oder eine Emulsion von Chlorophyllipoid und hydroider protoplasmatischer Grundsubstanz" darstellt. Mit dieser Annahme glaubt *Stern* zugleich die hohe Empfindlichkeit des Assimilationsvorgangs gegen oberflächenaktive Stoffe erklären zu können. *Willstätter*[1]) erhob gegen diese Auffassung unter Aufrechterhaltung seines alten Standpunkts mit aller Entschiedenheit Widerspruch und bemerkt:

„Befunde über das Verhalten des Chlorophylls im Blatte sprechen dafür, daß sich das Pigment der Chloroplasten nicht frei, molekular gelöst, sondern, wenigstens in der Hauptmenge, in einem Adsorptionszustand befindet, der sein Löslichkeitsverhalten entstellt."

Eine ähnliche Ansicht wird von *Lubimenko*[2]) vertreten, der eine Bindung, und zwar eine vermutlich chemische Bindung des Farbstoffs an Eiweiß annimmt. Er erhielt aus Aspidistrablättern wässerige Chlorophyllauszüge, in denen der Farbstoff mit Alkohol wie ein Eiweißkörper ausgefällt werden kann und die spektroskopisch mit dem Chlorophyll im lebenden Blatte übereinstimmen. Nach Ansicht des Verfassers ist in dieser Untersuchung keine sichere Entscheidung gegeben, da auch die von *Stern* als wesentlich erachteten Chloroplastenlipoide mindestens zum Teil in die Auszüge übergehen werden. Die Fluoreszenz hat *Lubimenko* nicht berücksichtigt. Auch die „Eiweiß-Chlorophyllverbindungen", die *Eisler* und *Portheim*[3]) durch Zusatz von Serum oder von wässerigen Pflanzenextrakten zu alkoholischen Blattauszügen erzeugt haben und deren Fluoreszenz sie betonen, sind zur Klärung der Frage nach dem Zustande des Farbstoffs im lebenden Blatte wegen ihres Lipoidgehalts nicht geeeignet.

Von der funktionellen Seite ausgehend kam der Verfasser[4]) zur Ablehnung der Chlorophyllauflösung in den Chloroplastenlipoiden, ungeachtet der Fluoreszenz, die im lebenden wie im abgetöteten Blatte nachweisbar ist. Er zeigte, daß im Blatte, dessen Assimilationstätigkeit gehemmt worden war, wie auch in abgetöteten Blättern photooxydative Prozesse vor sich gehen, die den fluoreszierenden Zustand des Farbstoffs zur Voraussetzung haben, und fand weiterhin eine fast normale Photooxydationsgröße in Blättern, denen nach Trocknung die Lipoide mittels

[1]) *R. Willstätter*, Ber. d. Deutsch. Chem. Ges. **55**, 3601, 1922. Anmerkung auf S. 3604.

[2]) *V. Lubimenko*, C. r. Acad. Sc. Paris **173**, 365, 1921.

[3]) *M. Eisler* und *L. Portheim*, diese Zeitschr. **130**, 497, 1922.

[4]) *Kurt Noack*, Zeitschr. f. Bot. **17**, 481, 1925.

Petrolätherextraktion unter Erhaltung des Chlorophyllgehalts möglichst entzogen worden waren.

Aus den mitgeteilten Befunden heben sich folgende Einzelheiten heraus: 1. Rotfluoreszenz im lebenden und im toten Blatte, die an sich der Annahme einer echten Chlorophyllösung im Chloroplasten günstig ist, 2. die von *Willstätter* mit guten Gründen gestützte Möglichkeit einer Bindung des Farbstoffs an andere hochmolekulare Stoffe.

Im vorliegenden Bericht glaubt der Verfasser den experimentellen Nachweis einer irgendwie gearteten Bindung des Chlorophylls an Chloroplasteneiweiß zu liefern und mit der Fluoreszenz des lebenden Blattes in Einklang zu bringen.

Allgemeine Methoden.

Zunächst wurde versucht, fluoreszierende Chlorophylladsorptionsverbindungen im Modell herzustellen. Nachdem dies gelungen war, wurden die Chloroplasten selbst untersucht.

Infolge der lichtzerstreuenden Wirkung der Nebenbestandteile des Versuchsmaterials war sichtbares Licht zur Feststellung der Rotfluoreszenz ungeeignet, so daß die Untersuchungen teils makro-, teils mikroskopisch mit der *Zeiss*schen Lumineszenzeinrichtung im ultravioletten Licht vorgenommen werden mußten.

I. Modellversuche mit verschiedenen Adsorbentien.

1. Versuche mit „Aluminiumhydroxyd C".

Als brauchbarstes Adsorptionsmittel erwies sich „Aluminiumhydroxyd C", das von *Willstätter* zur Fermentreinigung verwandt worden ist und das nach der Methode von *Willstätter* und *Kraut*[1]) hergestellt wurde.

Zunächst wurde eine kolloidale, also nicht fluoreszierende, wässerige Lösung von chemisch reinem Chlorophyll a + b mit feuchtem Aluminiumhydroxyd C geschüttelt, wobei vollständige Adsorption eintrat. Jedoch zeigte das durch Zentrifugieren abgeschiedene Präparat keine Rotfluoreszenz, auch nicht in dünnster Schicht unter dem Mikroskop. Auch nach Trocknen über Phosphorpentoxyd im Vakuum war keine Rotfluoreszenz wahrzunehmen. Nach Zusatz von leichtsiedendem Petroläther war ebenfalls keine Fluoreszenz zu bemerken, wohl aber nach Zusatz von höher siedendem, der das Auftreten roter Höfe um die einzelnen Aluminiumhydroxydteilchen verursachte. Der letzte Befund steht im Einklang mit der Löslichkeit des Chlorophylls, das sich in reinem Zustande nur in höher siedendem Petroläther löst und dabei zur Fluoreszenz kommt. Es sind also in dem beschriebenen Falle, wie zu

[1]) *R. Willstätter* und *H. Kraut*, Ber. d. Deutsch. Chem. Ges. **56**, 1117, 1923.



erwarten stand, die kolloiden Farbstoffteilchen als solche von dem feuchten Aluminiumhydroxyd adsorbiert worden.

Nicht anders war der Befund, als molekulardisperse Chlorophylllösungen in verschiedenen organischen Lösungsmitteln mit feuchtem Aluminiumhydroxyd geschüttelt wurden. Es wurde z. B. eine durch Zusatz von wenig Methylalkohol in leichtsiedendem Petroläther hergestellte, stark fluoreszierende Farbstofflösung mit dem Adsorbens geschüttelt. Bei allen angewandten Farbstoffkonzentrationen trat vollständige Adsorption ein; auch hier zeigte sich nach Entfernung des Lösungsmittels im Vakuum keine Spur einer Rotfluoreszenz. Der Farbstoff hatte also bei der Adsorption entweder seinen molekulardispersen Zustand verloren oder hat, was ebenfalls denkbar wäre, infolge der adsorptiven Bindung die Fluoreszenzfähigkeit ohne Änderung des molekulardispersen Zustandes eingebüßt. Im ersten, näherliegenden Falle war an die Mitwirkung des im Aluminiumhydroxyd vorhandenen Wassers zu denken, das eine Vereinigung der Farbstoffmoleküle zu Kolloidteilchen zur Folge haben konnte.

Bei den weiteren Versuchen wurde daher Wasser ausgeschlossen. *Willstätter* und *Kraut* haben eine Trocknungsmethode für Tonerdegele zwecks Bestimmung ihres Wassergehalts angegeben, die für vorliegenden Zweck, wie der Erfolg zeigte, vereinfacht werden konnte. Das feuchte Aluminiumhydroxyd C wurde während einiger Tage mit gewöhnlichem und wasserfreiem Aceton, hierauf mit wasserfreiem Äther behandelt und im Vakuumexsikkator über Phosphorpentoxyd von organischer Flüssigkeit befreit. Das Präparat, das im kurzwelligen Lichte weißblaue Fluoreszenz zeigte, wurde fein zerrieben und mit petrolätherischer Chlorophyllösung (0,5 mg Chlorophyll auf 15 ccm Petroläther mit etwas Methylalkohol) geschüttelt. Schon bei kurzem Schütteln trat völlige Adsorption ein, obwohl organisches Lösungsmittel vorlag. Nachdem dieses durch zweitägiges Evakuieren des dunkelgrünen Sediments wohl restlos entfernt worden war, zeigte das Präparat im Lumineszenzmikroskop leuchtende Rotfluoreszenz; diese ist auch jetzt, d. h. an den in Glas mit Korkverschluß ohne Vorsichtsmaßregeln 10 Monate lang aufbewahrten Präparaten, noch in der ursprünglichen Stärke vorhanden. Wasserzusatz bewirkte keine wesentliche Schwächung der Fluoreszenz.

Selbstverständlich mußte auf vollständige Abwesenheit von Fetten und Lipoiden Bedacht genommen werden; der angewandte Petroläther und Methylalkohol war in dieser Hinsicht einwandfrei, wie sich daraus ergab, daß der Verdampfungsrückstand der Farbstofflösung auch in dünnster Schicht keine Spur von Fluoreszenz zeigte. Nebenbei sei bemerkt, daß das kristallinische Chlorophyllausgangsmaterial auch nach stärkster Zerkleinerung ebenfalls völlig fluoreszenzfrei war.

Keines der anderen untersuchten, in trockenem Zustande angewandten Adsorptionsmittel ergab Präparate, deren Fluoreszenzstärke dem genannten Tonerdeadsorbat gleichgekommen wäre. Z. B. ließ sich der Farbstoff aus petrolätherischer Lösung quantitativ an Kaolin adsorbieren; der adsorbierte Farbstoff zeigte nur schwache, wenn auch deutliche Rotfluoreszenz, die nach Wasserzusatz nicht abnahm; höchstens spurenweise Fluoreszenz war an Aluminiumoxydadsorbaten zu sehen. Die Untersuchung war hier dadurch erschwert, daß das Aluminiumoxyd trotz feinster Verteilung nur wenig Farbstoff aus petrolätherischer Lösung aufnahm und seinerseits gelbrot fluoreszierte.

2. *Versuche mit Eiweißkörpern.*

Durch die Versuche mit Aluminiumhydroxyd C ist erwiesen, daß die Fluoreszenz des Chlorophylls im lebenden Blatte mit der Annahme einer adsorptiven Bindung nicht im prinzipiellen Widerspruch steht. Es war daher im weiteren der Nachweis der Fluoreszenz des Chlorophylls nach Adsorption an Eiweißkörper zu versuchen, d. h. an die Stoffe, die im Blatte in erster Linie für die Farbstoffbindung in Frage kommen.

Am nächstliegenden wäre es, solche Versuche mit genuinem Chloroplasteneiweiß anzustellen; jedoch sind die bisherigen Bemühungen nicht nach Wunsch ausgefallen. Daher wurde zunächst versucht, die Beziehungen, die zwischen Chlorophyll und Blutfarbstoff bestehen, in dem Sinne zu erweitern, daß vielleicht das Globin, die Eiweißkomponente des Blutfarbstoffs, als Adsorptionsmittel für das Chlorophyll geeignet wäre.

Freilich steht die Art der Bindung des Hämochromogens an das Globin noch nicht fest. *Madinaveitia*[1]), ein Schüler *Willstätters*, wie auch *Willstätter* und *Stoll*[2]) halten das Hämoglobin für eine kolloide Adsorptionsverbindung, während *Fischer* und *Schneller*[3]) auf Grund der zahlenmäßigen Konstanz der beiden Komponenten im Hämoglobin eine Molekülverbindung erblicken. *Roche*[4]) verneint das Vorliegen einer Salzverbindung, d. h. einer echten chemischen Bindung zwischen Globin und prostethischer Gruppe.

Das Globin wurde aus Hämoglobin *Merck* nach der Pyridin-Acetonmethode gemäß *Kiyotaki*[5]) hergestellt und, was für den vorliegenden Zweck unumgänglich war, durch mehrtägige Behandlung mit Lipoidsolventien lipoidfrei gemacht. Das trockene Präparat (0,1 g) nahm aus petrolätherischer Chlorophyllösung (0,5 oder 1 mg in 20 ccm)

[1]) *A. Madinaveitia*, Zur Kenntnis der Katalase. Diss., Zürich 1912.
[2]) *R. Willstätter* und *A. Stoll*, Ann. d. Chem. **416**, 21, 1918.
[3]) *Hans Fischer* und *K. Schneller*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **128**, 230, 1923.
[4]) *J. Roche*, C. r. Soc. Biol. **94**, 463, 1926.
[5]) *U. Kiyotaki*, diese Zeitschr. **134**, 322, 1922.



etwa 90 Proz. des Farbstoffs auf. Das Adsorbat zeigte nach Entfernen des Lösungsmittels tatsächlich Rotfluoreszenz, jedoch in weit schwächerem Maße als die Aluminiumhydroxyd-C-Präparate; nur in sehr dünner Schicht war im Mikroskop dunkelrote Fluoreszenz zu erkennen, die in chlorophyllfreien Kontrollen nicht vorhanden war. Immerhin ist bemerkenswert, daß keiner der anderen untersuchten Eiweißkörper Verhältnisse wie das Globin zeigte. Untersucht wurden Albumin, Casein, Legumin, Hordenin, Clupeinsulfat[1]) nach gründlicher Vorbehandlung mit Lipoidsolvenzien. Diese Eiweißkörper adsorbierten den Farbstoff aus petrolätherischer Lösung annähernd gleich stark, jedoch nur in geringem Maße; eine Rotfluoreszenz war nirgends nachzuweisen, höchstens das Hordeninadsorbat zeigte schwache dunkelrote Fluoreszenz. Auch mit Pepton, das ganz gut adsorbierte, wurden keine Resultate erhalten. Nebenbei wurde Tristearin mit petrolätherischer Chlorophyllösung geschüttelt. Trotz geringster Adsorption zeigte sich nach Entfernen des Petroläthers starke hellrote Fluoreszenz, die anhaltend war. Es handelt sich hier wohl um Farbstoffauflösung im Tristearin, dessen äußere Schichten durch den Petroläther vorübergehend gelöst worden waren, so daß eine molekulardisperse Auflösung des Chlorophylls in dem Tristearin-Petroläthergemisch erfolgte und nach Entfernung des Petroläthers erhalten blieb. Ähnliches hat schon *Reinke*[2]), allerdings mit unreinem Chlorophyll, an festem Paraffin nachgewiesen.

Aus den obigen Ausführungen erhellt, daß zur Herstellung fluoreszierender Chlorophylladsorbate Abwesenheit von Wasser unter den gegebenen Verhältnissen Vorbedingung war. Immerhin mögen noch einige Versuche in Gegenwart von Wasser mitgeteilt werden: Aluminiumoxyd, Kaolin, Talk, Kieselgur, ebenso Pepton adsorbierten den Farbstoff aus kolloidaler, wässeriger Lösung nicht, ebensowenig Pepton, während Globin schwache Adsorption ohne Fluoreszenz der Partikel ergab. Andererseits adsorbierte, wie schon früher erwähnt, feuchtes Aluminiumhydroxyd C kolloidales Chlorophyll ebenfalls ohne Fluoreszenz, aber so stark, daß Zusatz von Methylalkohol bis zu 65 Proz. keine Elution zur Folge hatte und nicht zur Aufspaltung der adsorbierten Kolloidteilchen in fluoreszierende Moleküle ausreichte.

Um eine Oberflächenvergrößerung des Adsorbens zu erreichen, wurde unter anderem mit Pepton ein Versuch derart angestellt, daß dieses in Gegenwart des Farbstoffs aus seiner Lösung abgeschieden

---

[1]) Die Eiweißkörper verdankte der Verfasser zum Teil der Liebenswürdigkeit der Herren *Bergmann*-Dresden und *Waldschmidt-Leitz*-München, wofür auch an dieser Stelle bestens gedankt sei.

[2]) *J. Reinke*, Ber. d. Deutsch. Botan. Ges. **1**, 395, 1883; **2**, 265, 1884.

wurde. So wurde eine wässerige Peptonlösung mit einer molekulardispersen Aceton-Chlorophyllösung versetzt. Es entstand eine sehr feine, stark grün gefärbte Ausflockung, die nach mehrmaligem, raschem Waschen mit Wasser und Entfernen des Acetons durch Evakuieren bei 35° ganz schwache Rotfluoreszenz zeigte.

Eine spektroskopische Charakterisierung des Fluoreszenzlichts wurde in keinem Falle vorgenommen, da eine Störung der Resultate durch Rotfluoreszenz der angewandten Adsorbentien in den positiven Fällen nicht zu befürchten war, wie sich dies auch aus den folgenden Versuchen ergibt. Die meisten der angewandten Stoffe zeigten fahlblaue Fluoreszenz.

3. Versuche mit Chlorophyll-Rohextrakten.

Zu den folgenden Versuchen wurden an Stelle reinen Chlorophylls Methylalkohol- und Acetonextrakte aus Blättern angewandt; sie sind insofern von Interesse, als hier infolge der Anwesenheit von Lipoiden von vornherein mit anderen Resultaten zu rechnen war, die zugleich zur Kontrolle der Hauptversuche dienen konnten.

Methylalkoholische Extrakte aus Selaginellapflanzen wurden zur Hälfte mit Wasser verdünnt und mit Kaolin geschüttelt; nach Waschen des ziemlich stark grün gefärbten Adsorbats zeigten die Kaolinteilchen im Lumineszenzmikroskop sehr starke Rotfluoreszenz, die in keinem Verhältnis stand zu der schwachen Rotfluoreszenz reinen, an Kaolin unter Wasserauschluß adsorbierten Chlorophylls. Bei Anwendung von Acetonextrakten war die Rotfluoreszenz des Kaolins, entsprechend der in Aceton geringeren Löslichkeit der Lipoide, deutlich schwächer.

Auch bei Eingießen von methylalkoholischen Blattextrakten in wässerige Casein- oder Peptonlösungen ließen sich deutlich fluoreszierende, grüne Ausfällungen erzielen.

Kolloidale Farbstofflösungen, die aus den alkoholischen Rohextrakten hergestellt waren, ergaben beim Schütteln mit Kaolin oder Aluminiumhydroxyd C ebenfalls schwache Rotfluoreszenz im Mikroskop. Wurde Aluminiumhydroxyd C zunächst mit Lecithin beladen, so zeigten die durch Schütteln mit kolloidaler Rohchlorophyllösung erzielten Adsorbate weit stärkere Fluoreszenz als ohne Lecithinvorbehandlung.

Die mitgeteilten Befunde zeigen also im Prinzip die Möglichkeit, die Tatsache der Rotfluoreszenz des Chlorophylls im lebenden Chloroplasten von der dieserhalb aufgestellten Behauptung einer molekulardispersen Auflösung des Farbstoffs in den Chloroplastenlipoiden abzutrennen, da es gelang, Chlorophylladsorbate an feste Substanzen herzustellen, so daß dabei die Rotfluoreszenz des Farbstoffs zum deutlichsten Ausdruck kommt und damit eine Adsorption des Chlorophylls in mono-



molekularer Schicht anzunehmen ist, wie eine solche von Paneth[1]) *und van der Grinten*[2]) *für die Adsorptionsweise anderer Farbstoffe erwiesen wurde.* Die Tatsache der Fluoreszenzfähigkeit adsorbierter Farbstoffe in trockenem Zustande, die sich auch beim Reinchlorophyll in festem Zustande nicht findet, ist schon von *Kautsky*[3]) festgestellt, der Echtsäureeosin, Rhodamin und andere an kristallinische Siliciumverbindungen adsorbieren ließ und an diesen Adsorbaten die für den betreffenden Farbstoff typische Fluoreszenz erhalten fand.

II. Versuche mit Chloroplasten.

Im folgenden wird gezeigt, daß an den Chloroplasten selbst Erscheinungen gefaßt werden können, die mit einer Adsorption des Chlorophylls an Bestandteile des Chloroplasten, und zwar an dessen Eiweiß, in Einklang stehen. Zunächst wurde eine schonende Isolierung der Chloroplastenmasse versucht. Es war anzunehmen, daß die chemisch-physikalische Beschaffenheit der Chloroplasten nicht allzu stark verändert wird, wenn die Isolierung ohne Anwendung organischer Lösungsmittel, die sowohl lipoidlösend als auch eluierend wirken, vorgenommen werden könnte. Deshalb wurde eine Extraktion mit Wasser bei Zimmertemperatur folgendermaßen vorgenommen:

Die Blätter (etwa 10 bis 20 g Frischgewicht) wurden mit Calciumcarbonatzusatz im Porzellanmörser unter Zugabe von wenig Wasser fein zerrieben. Das Reibgemisch wurde in etwa 50 ccm Wasser aufgenommen und zunächst bei hoher Tourenzahl kurz vorzentrifugiert, wodurch Zellwandbruchstücke, Kristalle und das zugesetzte Calciumcarbonat abgeschieden wurden. Die meist undurchsichtig grün gefärbte Flüssigkeit wurde hierauf filtriert, wobei außer dem letzten Rest von festen Bestandteilen nur kleine Spuren der grünen Substanz auf dem Filter zurückblieben. Selbst durch Hartfilter ging die gesamte grüne Substanz hindurch, wurde aber im Gegensatz zu kolloidalem, reinem Chlorophyll von den „feinen" Membranfiltern nach *Zsigmondy* zurückgehalten, soweit die Lösung nicht stark verdünnt wurde; in diesem Falle ging ein kleiner Teil des Farbstoffs, vielleicht als Abspaltungsprodukt, durch das Feinfilter hindurch. Die durch Weichfilter filtrierte Lösung wurde nochmals kurz vorzentrifugiert und nach Dekantieren bei hoher Tourenzahl ½ Stunde oder länger scharf zentrifugiert. Hierbei setzte sich bei allen Pflanzen ein dunkelgrünes, schmieriges Sediment ab, das, mit Ölimmersion untersucht, nur feinste grüne, in farbloser Flüssigkeit suspendierte, runde Teilchen zeigte, die weit kleiner als

---

[1]) *Fr. Paneth*, Zeitschr. f. Elektrochem. **28**, 113, 1922.
[2]) *K. van der Grinten*, Journ. chim. phys. **23**, 209, 1926.
[3]) *H. Kautsky*, Zeitschr. f. physikal. Chem. **120**, 230, 1926.

die Chloroplasten waren. Die überstehende Flüssigkeit war je nach Pflanzenart und Dauer des Zentrifugierens noch mehr oder weniger grün oder auch nur bräunlich gefärbt.

Die vom Reibgemisch abfiltrierte Lösung zeigte bei Bestrahlung mit ultraviolettem Lichte im Reagenzglas starke Rotfluoreszenz. Noch bedeutend stärker war die Rotfluoreszenz des Sediments, besonders wenn es mittels Quarzobjektträgers auf den Quarzkondensor der Lumineszenzeinrichtung gebracht wurde. Obwohl das Sediment so konsistent war, daß es beim Umkehren der Zentrifugengläser nicht ausfloß, ließ es sich bei kurzem Schütteln mit Wasser leicht in auffallend klare Lösung bringen, die im sichtbaren Lichte starkes Tyndallphänomen und im ultravioletten Lichte ebenfalls starke Rotfluoreszenz zeigte. Neuerliches scharfes Zentrifugieren bewirkte wiederum Abscheidung der gefärbten Substanz unter Erhaltung der Fluoreszenz, die übrigens auch beim Eintrocknen des Sediments zu Lamellen im Vakuumexsikkator über Phosphorpentoxyd erhalten blieb. Die chemische Struktur des Chlorophylls wird durch diese Behandlung nicht verändert, wie der normale Ausfall der Lactam- und der Basizitätsprobe zeigte. Eintrocknung bei 70^0 bewirkte dagegen Phytolabspaltung. Selbstverständlich waren auch die Carotinoide im Sediment vorhanden.

Es kann ohne weiteres angenommen werden, daß diese Sedimente der Hauptmasse nach aus Bestandteilen der Chloroplasten bestehen.

Unter der Voraussetzung einer adsorptiven Bindung des Chlorophylls an das Chloroplasteneiweiß wurde nun versucht, die Rotfluoreszenz der aus den gereinigten Sedimenten hergestellten wässerigen Lösungen durch solche Mittel zu beeinflussen, die Eiweißdenaturierung zur Folge haben. Die ersten Untersuchungen, in denen die Sedimentlösungen einige Minuten im Reagenzglas gekocht worden waren, ergaben keine Änderung der Fluoreszenz. Jedoch war daran zu denken, daß die Erhitzung außer der Eiweißdenaturierung eine Auflösung des etwa vom Eiweiß abgetrennten Chlorophylls in den Lipoiden zur Folge haben könnte. Deshalb wurde die Erhitzungsdauer möglichst abgekürzt.

Zu dem Zwecke wurden die frischen Sedimentlösungen in dünnwandige, gleichmäßig ausgezogene Kapillaren von 15 cm Länge gebracht, deren Enden zugeschmolzen wurden. Die Kapillaren wurden hierauf verschieden lange Zeit in kochendes Wasser gestellt und zugleich mit nicht erhitzten Kontrollen auf dem Kondensor der Lumineszenzeinrichtung auf Fluoreszenzhelligkeit geprüft. Frische Sedimente zeigten, auf diese Weise untersucht, makroskopisch leuchtend rote Fluoreszenz im Lichtkegel des Kondensors.

Die im folgenden angeführten Resultate wurden bei allen untersuchten Pflanzen gleichermaßen erhalten. Zur Verwendung kamen hauptsächlich Spinat- und Aspidistrablätter, aus später anzuführenden Gründen, ferner Grasblätter, Selaginellapflanzen und andere.

Wurden die Sedimente 1 bis 30 Sekunden auf 100° erhitzt, so war die Fluoreszenz vollständig oder nahezu vollständig vernichtet. Bei längerem Erhitzen (60 Sekunden und mehr) begann die Fluoreszenz wieder aufzutreten bzw. deutlich stärker zu werden, so daß nach 3 bis 4 Minuten langem Erhitzen die ursprüngliche Stärke wieder erreicht war.

Um die Möglichkeit auszuschließen, daß das Verschwinden der Fluoreszenz auf einer optischen Täuschung beruht, die unter anderem dadurch verursacht sein konnte, daß das koagulierte Eiweiß mit seiner bläulichweißen Fluoreszenz lediglich eine vorhandene Rotfluoreszenz überdeckte, wurden kurz erhitzte Lösungen mit frischen in verschiedenen Verhältnissen gemischt. Auch wenn die Menge des erhitzten Anteils sechsmal größer war als die des frischen, war die Fluoreszenz des frischen Anteils noch deutlich zu sehen. Optische Täuschung lag also nicht vor, was sich übrigens auch aus dem Wiederauftreten der Fluoreszenz bei längerer Erhitzung ergibt.

a) Das Verschwinden der Fluoreszenz und seine Ursache.

Wenn nun die so bewirkte Fluoreszenzvernichtung eine Folge der Eiweißkoagulation darstellt, so mußten die für beide Prozesse hinreichenden Minimaltemperaturen übereinstimmen. Ein solcher Versuch wurde mit Sedimentlösungen aus Spinatblättern bei einer jeweiligen Erhitzungsdauer von 30 Sekunden vorgenommen:

90, 85, 75°	keine Fluoreszenz
70°	schwache Rotfluoreszenz
65°	leuchtend rote Fluoreszenz
nicht erhitzte	leuchtend rote Fluoreszenz

Der physiologische Zustand des Blattes spielte keine große Rolle. Spinatblätter, die 24 Stunden bei 37° gehalten worden waren, ergaben dieselben Resultate, ebenso Blätter, die halbwelk zur Untersuchung kamen. Andererseits lieferten Spinatblätter, die 14 Tage im Exsikkator gelegen waren, ein sich rasch absetzendes Sediment, das nur schwach fluoreszierte, obwohl nach der Lactam- und Basizitätsprobe normales Chlorophyll vorhanden war. Somit waren hier Umlagerungen im Chloroplasten vor sich gegangen.

Soweit das Verschwinden der Fluoreszenz auf Erhitzen in Frage steht, ergibt sich also, daß die hierzu nötige Minimaltemperatur mit der für Eiweißdenaturierung anzuwendenden zusammenfällt. Daraus muß der Schluß gezogen werden, daß das Chlorophyll auf Grund der Eiweißkoagulation in den kolloidalen, nicht fluoreszierenden Zustand übergeht und mithin normalerweise an das Chloroplasteneiweiß adsorptiv oder in einer anderen lockeren Weise in monomolekularer Schicht gebunden ist.

Über die Einzelvorgänge dieser Erscheinung kann nichts ausgesagt werden. Da nach *Freund* und *Lustig*[1]) die Eiweißkoagulation mit Wasseraufnahme verbunden ist, wäre es möglich, daß damit die Bildung kolloidaler Farbstoffteilchen erleichtert wird, nachdem durch die mit der Erhitzung verbundene Strukturänderung des Substrats die Bindung des Farbstoffs an dieses aufgehoben worden ist. Eine neuerliche Adsorption des Farbstoffkolloids an das denaturierte Eiweiß ist damit nicht ausgeschlossen. Zusatz von 1 bis 5 Proz. Kochsalz zu den frischen Sedimentlösungen hatte eine Herabsetzung der für Fluoreszenzvernichtung nötigen Minimaltemperatur um 2 bis 3° zur Folge. Unter Gleichsetzung von Fluoreszenzvernichtung mit Eiweißkoagulation steht dies im Gegensatz zu den Ergebnissen der eben genannten Autoren, die, wie auch schon andere, durch Salzzusatz eine Erhöhung des Hitzekoagulationspunkts erhielten. Zusatz von 0,35 bis 3,5 Proz. Formaldehyd hatte ebenfalls eine ganz schwache Herabsetzung der Minimaltemperatur für Fluoreszenzvernichtung zur Folge, was hier insofern bemerkenswert ist, als nach zahlreichen Feststellungen [z. B. *Blum*[2])] Eiweiß nach Formaldehydzusatz beim Kochen nicht mehr koaguliert. Unter der obigen Voraussetzung würde dies besagen, daß die Erhitzung einer mit Formaldehyd versetzten Eiweißlösung auch bei fehlender Koagulation irgendwelche Zustandsänderungen hervorruft, wie ja auch *Hardy*[3]) u. a. betonen, daß Denaturierung und Flockung bei Hitzegerinnung zwei verschiedene Prozesse sind. Diesen Fragen ist hier nicht weiter nachgegangen worden.

Wenn also eine lockere Bindung des Chlorophylls an das Chloroplasteneiweiß als wahrscheinlich erachtet werden darf, so muß die Fluoreszenz des Farbstoffs erhalten bleiben, wenn das Chloroplasteneiweiß der Sedimentlösungen durch fällende Mittel ausgeflockt wird. Mit Bleiacetat und Ammoniumsulfat ließ sich eine vollständige Ausflockung der grünen Substanz aus Sedimentlösungen erzielen. Der Niederschlag zeigte in allen Fällen starke Rotfluoreszenz und verlor diese nach 1 Sekunde langer Erhitzung auf 100°. Dieser Befund steht damit in Einklang, daß die genannten Stoffe das Eiweiß wohl aussalzen, jedoch nur langsam denaturieren. Auch bei den Ammonsalzausflockungen lag die für Fluoreszenzvernichtung nötige Minimaltemperatur tiefer als bei den frischen Sedimentlösungen; 30 Sekunden langes Erhitzen auf 65° bewirkte schon deutliche Fluoreszenzabschwächung. Die Salzausflockungen halten den Farbstoff sehr fest; 50proz. Äthylalkohol oder Methylalkohol löste nur sehr wenig Farbstoff heraus.

[1]) *E. Freund* und *B. Lustig*, diese Zeitschr. **167**, 355, 1926.
[2]) *F. Blum*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **22**, 127, 1896.
[3]) *W. B. Hardy*, Journ. of Physiol. **24**, 158, 288, 1899.

Nach Schütteln der Salzniederschläge mit Wasser lösten sich diese wieder kolloidal auf.

Um eine ungefähre Charakterisierung der in Frage stehenden Eiweißkörper zu ermöglichen, wurden in den aus Spinat erhaltenen Sedimentlösungen die Fällungsgrenzen in Ammonsulfat nach dem von *Kestner*[1]) angegebenen Verfahren bestimmt. Die Fällungsgrenzen waren 2,8 und 1,9. Der Eiweißkörper ist also leichter als die Globuline aussalzbar.

Über die Eiweißkörper der Spinatblätter liegen wertvolle Untersuchungen von *Osborne* und *Wakeman*[2]) vor, aus denen manche indirekte Bestätigung der hier vorgetragenen Ansichten herausgelesen werden kann. Die Verfasser stellten ebenfalls wässerige Extrakte her, aus denen sie durch Alkoholzusatz einen dunkelgrünen Niederschlag in zwei Fraktionen erhielten. Nach Farbstoffextraktion mittels Alkohols und Äthers hinterblieb eine halbfeste, fettige Masse, die etwa 14 Proz. Stickstoff, bezogen auf das aschefreie Produkt, enthielt. Die Verfasser betonen die geringe Löslichkeit ihres ersten Präzipitats, das im Gegensatz zu den meisten anderen Proteinarten bei Zimmertemperatur in 0,2- bis 0,3proz. Natronlauge sich nur zum kleinsten Teil löste und erst durch kochende alkoholische, 0,2- bis 0,3proz. Natronlauge in Lösung gebracht wurde. Das zweite Präzipitat verhielt sich dagegen wie ein gewöhnliches Protein. Aus der alkoholischen Lösung konnte der erste Eiweißkörper durch Neutralisieren wieder ausgefällt werden, so daß der neue Niederschlag in schwachem Alkali jetzt leicht löslich war. Die Verfasser vermuten daher, daß dieses Protein ursprünglich mit anderen Stoffen verbunden war und erst durch Alkalihydrolyse frei gemacht wurde. Da außerdem bei der ersten Fällung mit Alkohol der größte Teil des Chlorophylls, der Phosphatide usw. in Lösung ging, halten sie es für möglich, daß in den Blattzellen die genannten Stoffe und vielleicht noch andere „in chemical union as a complex“ vorhanden sind, der sehr empfindlich gegen Alkohol ist.

Ferner ist hier auf die Untersuchungen von *Lubimenko*[3]) hinzuweisen, der sich bemühte, zu spektroskopischen Untersuchungen wässerige Chlorophyllextrakte aus frischen Blättern zu erhalten und hierzu nur Aspidistrablätter geeignet fand, da die Extrakte aus anderen Pflanzen mehr oder weniger rasch koagulierten. Der Verfasser unterließ also das Abzentrifugieren und Wiederaufnehmen in reinem Wasser, womit er bei den meisten Pflanzen brauchbare Lösungen erhalten hätte. Auch *Lubimenko* vermutet auf Grund der Fällbarkeit der grünen Substanz durch wenig Alkohol, daß es sich um eine Bindung zwischen Eiweiß und Chlorophyll handelt, und glaubt, daß diese chemischer Art ist. Die Fluoreszenz hat *Lubimenko* nicht berücksichtigt.

Dieser Angaben wegen untersuchte der Verfasser das Verhalten der aus Aspidistra erhaltenen Lösungen etwas genauer. Die mittels der weiter oben beschriebenen Methode erhaltenen Lösungen fluoreszierten im ultravioletten Lichte stark rot. Durch stundenlanges, scharfes Zentrifugieren wurde reichlich dunkelgrünes, stark rot fluo-

---

1) *O. Kestner*, Chemie der Eiweißkörper, S. 178. Braunschweig 1925.
2) *Th. Osborne* und *A. Wakeman*, Journ. of biol. Chem. **42**, 1, 1920.
3) *V. Lubimenko*, C. r. Acad. Sc. Paris **173**, 365, 1921.

reszierendes Sediment abgeschieden; während des manchmal unterbrochenen Zentrifugierens nahm die Fluoreszenz der überstehenden Flüssigkeit allmählich bis auf Null ab, obwohl diese stark grün gefärbt blieb und mit Bleiacetat vollständige Ausfällung der grünen Substanz ergab, die ebenfalls nicht fluoreszierte. Die anderen hier untersuchten Pflanzen verhielten sich insofern anders, als ihr Farbstoff bei langem Zentrifugieren vollständig sedimentiert wurde, so daß die überstehende Flüssigkeit nur braungelb gefärbt war. Dies spricht dafür, daß in wässerigen Extrakten von Aspidistra neben dem an Eiweiß gebundenen und daher leichter sedimentierbaren Chlorophyll kolloidal gelöstes und daher nicht ohne weiteres sedimentierbares vorhanden ist. Ob hier eine sekundäre Abspaltung vorliegt oder ob schon im lebenden Aspidistrablatt kolloidales Chlorophyll vorhanden ist, entzieht sich vorläufig der Entscheidung. Vielleicht hängt das Sonderverhalten der Aspidistraextrakte damit zusammen, daß, wie der Verfasser regelmäßig beobachtete, die Chloroplasten als solche sehr leicht aus dem Gewebeverband befreit werden können; unter dem Mikroskop sieht man bei leichtem Druck auf Blattquerschnitte ganze Wolken von scharf konturierten Chloroplasten in das umgebende Wasser strömen.

b) Das Wiederauftreten der Fluoreszenz bei längerem Erhitzen.

Es ist nun das Wiederauftreten der Fluoreszenz bei längerer Erhitzung der Sedimentlösungen zu besprechen. Hier handelt es sich offenbar um eine Auflösung des vom Eiweiß zunächst abgespaltenen Chlorophylls in den Chloroplastenlipoiden, die durch die Erwärmung der Chlorophyllaufnahme leichter zugänglich geworden sind. Bekannt ist, daß lipoide Chlorophyllösungen stark fluoreszieren. Es soll dahingestellt bleiben, ob die betreffenden Lipoide im Sinne von *Osborne* und *Wakeman* (l. c.) durch die Erhitzung vom Eiweiß abgespalten werden, oder ob sie, was dem Verfasser wahrscheinlicher vorkommt, wenigstens zum Teil im lebenden Blatte frei vorhanden sind. Betreffs der Möglichkeit der Chlorophyllüberführung in die Lipoide ist auf die Erfahrungen von *Willstätter* und *Stoll* (1913, S. 61, l. c.) hinzuweisen, die eine leichtere Extrahierbarkeit des Farbstoffs nach Abbrühen der Blätter feststellten; sie bemerken:

„Das Chlorophyll ist aus seinem kolloidalen Zustand in die Form einer wirklichen Lösung übergegangen, nämlich gelöst in seinen, infolge der Temperaturerhöhung verflüssigten, wachsartigen Begleitstoffen."

Wie früher erwähnt, hat sich *Willstätter* späterhin für einen Adsorptionszustand im lebenden Blatte entschieden, ohne sich über die Frage der kolloidalen oder molekulardispersen Verteilung dabei zu äußern.

Aus kolloidalen, wässerigen Lösungen reinen Chlorophylls läßt sich, wie *Willstätter* und *Stoll* fanden, der Farbstoff nur nach Kochsalzzusatz ausäthern. Im Gegensatz hierzu geht der Farbstoff aus den hier untersuchten Sedimentlösungen nach kurzem Schütteln ohne weiteres in Äther über; hierbei ist an die von *Osborne* und *Wakeman* (l. c.) beobachtete Lipoidabspaltung bei Lipoidproteiden durch Ätherbehandlung zu denken. Es wurden daher ätherische Extrakte aus den Sedimentlösungen auf dem Quarzobjektträger eingedampft. Der dunkelgrüne, fettige Rückstand zeigte in dünnster Schicht starke Rotfluoreszenz, die bei kurzem Erhitzen auf 100° nicht verschwand. Es kann sich demnach nur um eine durch den Ätherzusatz bedingte Lösung des Farbstoffs in Lipoiden handeln.

Wurden Ätherauszüge aus Sedimentlösungen mittels methylalkoholischer Kalilauge vom Farbstoff befreit, so resultierte beim Verdampfen des Äthers ein fettiger Rückstand. Nach Wiederaufnehmen in Äther, Schütteln der Ätherlösung mit wässeriger, kolloidaler Lösung reinen Chlorophylls und Vertreiben des Äthers zeigte die wässerige Lösung deutliche Fluoreszenz, die gegen Erhitzung auf 100° beständig war.

Wurden frische Sedimentlösungen mit 0,2proz. Sodalösung versetzt oder 30 Minuten lang einer Temperatur von 45° ausgesetzt, so ließ sich die Fluoreszenz durch kurzes Kochen nicht mehr vernichten. Schon nach 8 Minuten konnte im letzten Falle die Fluoreszenz durch 100° nur teilweise aufgehoben werden. Ebenso zeigten häufig 1 bis 2 Tage alte Sedimentlösungen Resistenz der Fluoreszenz gegen kurzes Erhitzen, wobei Lactam- und Basizitätsprobe meist das Vorhandensein normalen Farbstoffs vor dem Kochen bewiesen. Auch diese Befunde lassen sich ungezwungen mit einer durch die verschiedenen Versuchsbedingungen bewirkten Erleichterung der Farbstoffaufnahme durch die Lipoide erklären.

Auffallend war, daß kolloidale Lösungen chemisch reinen Chlorophylls bei langem Erhitzen (10 Minuten und mehr) ohne jeden Zusatz ebenfalls Fluoreszenzeigenschaft bekamen; vermutlich handelt es sich um Zersetzungsprodukte. Jedoch konnte kein bestimmter Anhaltspunkt bisher gefunden werden.

Die Vernichtung und das Wiederauftreten der Fluoreszenz ließ sich auch an mikroskopischen Blattschnitten beobachten. Bei 1 bis 30 Sekunden langem Kochen der Schnitte war die ursprüngliche, leuchtend rote Fluoreszenz meist gänzlich vernichtet oder wenigstens stark abgeschwächt, obwohl die Chloroplasten noch fast normale Form und Farbe besaßen. Auch kurze Erhitzung auf nur 75° bewirkte deutliche Fluoreszenzabschwächung. Bei längerem Kochen kehrte die Fluoreszenz

auch bei Blättern meist zurück. Öfters, so gerade auch bei Aspidistra, zeigte sich schon nach kurzem Erhitzen ein stark fluoreszierender Saum am Epidermisaußenrand, an dem sich wachsartige Stoffe befinden, die demnach durch Kochen ausgetretene Chlorophyllspuren molekulardispers aufgenommen hatten. In manchen Fällen, so bei der Grünalge Spirogyra, trat wohl Fluoreszenzvernichtung bei kurzem Kochen, aber keine Erneuerung dieser bei längerem Kochen ein. Da sich in den Chloroplasten dabei kleine, dunkelgrüne Tröpfchen zeigten, dürfte es sich hier um ein Zusammenfließen der Lipoide handeln, in denen sich so viel Farbstoff gelöst hat, daß das fluoreszenzerregende Licht nur einen Bruchteil der großen Farbstoffmenge traf, und auch das emittierte Licht von dem Farbstoff selbst größtenteils absorbiert wurde.

Blattschnitte, die 5 Minuten in 70- oder 80proz. Methylalkohol gelegt worden waren, eine Alkoholkonzentration, die den Farbstoff noch nicht extrahierte, zeigten nach Auswaschen normale Fluoreszenz, die bei kurzem Erhitzen ihre bisherige Intensität beibehielt. Auch dies kann nur in einer erst durch die Behandlung mit Alkohol bedingten Vereinigung des Farbstoffs mit den Lipoiden erklärt werden.

So fügen sich also auch die Untersuchungen an Blattschnitten in den Rahmen der ganzen Ausführungen ein.

c) Fermentative Abbauversuche am Chloroplasteneiweiß.

In einer weiteren Versuchsreihe wurde geprüft, ob nach Analogie mit den Befunden am Blutfarbstoff [von *Zeynek*[1])] Fluoreszenzvernichtung als Folge fermentativen Abbaues des Chloroplasteneiweißes in den Sedimentlösungen erreicht werden kann. Die Versuche fielen sehr ungleichmäßig aus. Dies ist einmal darin begründet, daß bei längerem Stehen oder rasch bei etwas erhöhter Temperatur an sich schon Lipoidübertritt des Farbstoffs stattfindet, zum zweiten scheinen die Chloroplastenlipoide, die im vorliegenden Falle nicht durch organische Lösungsmittel entfernt werden konnten, den Fermentangriff auf das Eiweiß zu hindern. Denn *Biedermann*[2]) fand, daß Trypsin in alkalischer Lösung das Plasma angeschnittener Zellen nicht angreift, jedoch in plasmolysierten und zwecks Lipoidentfernung mit Alkohol behandelten Schnitten auch in geschlossenen Zellen rasche Lösung der Chloroplasten bewirkt. Mit Pepsinsalzsäure, die im vorliegenden Falle wegen der Säurewirkung auf das Chlorophyll überhaupt nicht in Frage kam, konnte *Biedermann* auf keine Weise Plasmaverdauung erzielen.

Die Versuche wurden unter den verschiedensten Temperatur-, Zeit- und p_H-Bedingungen vorgenommen. Am besten verlief ein Versuch

---

[1]) *A. v. Zeynek*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **49**, 472, 1906; **70**, 224, 1910.
[2]) *W. Biedermann*, Flora, N. F. **111/112**, Stahl-Festschrift 1918, S. 560.



mit Trypsin (*Kahlbaum*) unter Zusatz von 0,2 Proz. Soda bei 44°. Nach 2¾ Stunden war gegenüber den fermentfreien Kontrollen eine starke Fluoreszenzabschwächung zu konstatieren, die nicht auf optischer Täuschung beruhte, da nach geringem Zusatz einer normal fluoreszierenden Kontrolle zum verdauten Gemisch die Fluoreszenz stark vermehrt war. Wurde die verdaute Lösung, die normal grün war, auf 100° erhitzt, so trat nach 3 Minuten starke Rotfluoreszenz auf. Es ist also das Chlorophyll infolge der Proteolyse zunächst in den kolloidalen, in Wasser gelösten Zustand übergegangen und bei der nachfolgenden Erhitzung von den Chloroplastenlipoiden aufgenommen worden. Lactam- und Basizitätsprobe ergaben vollständige Unversehrtheit des fermentativ freigelegten Farbstoffs.

d) Belichtungsversuche.

Der Verfasser hat früher (l. c.) gezeigt, daß das Chlorophyll in fluoreszierendem Zustande starke photooxydative Wirkung besitzt, die sich mangels geeigneter anderer Akzeptoren in einer Ausbleichung des Farbstoffs selbst äußert, derart, daß echt gelöstes Chlorophyll um ein Vielfaches lichtempfindlicher ist als kolloidal gelöstes, d. h. nicht fluoreszierendes. Dieser Unterschied in der Lichtempfindlichkeit war nun auch nachweisbar zwischen frischen Sedimentlösungen und solchen, die durch kurzes Erhitzen und den damit verbundenen Übergang in den kolloidalen Zustand die Fluoreszenzfähigkeit verloren hatten: Frische Sedimentlösungen aus Spinatblättern bleichten im direkten Sonnenlicht in 5 Minuten völlig aus, während die zuvor kurz erhitzten noch normal grün waren und erst in 1 bis 2 Stunden vollständig zerstört wurden.

Der Verfasser glaubt auf Grund aller hier mitgeteilten Versuche, in ergänzender Bestätigung der Ansicht *Willstätters*, zu der Behauptung berechtigt zu sein, daß der Chlorophyllfarbstoff in der lebenden Zelle an das Eiweiß der Chloroplasten irgendwie, vermutlich adsorptiv, in monomolekularer Schicht gebunden ist, ein Befund, der in Anbetracht des außerordentlichen Stoffumsatzes im Assimilationsapparat von vornherein hohe Wahrscheinlichkeit für sich hat. Ob daneben in den Chloroplasten etwa kolloidales Chlorophyll vorkommen kann, entzieht sich zunächst der Beurteilung, wäre aber aus regulatorischen Gründen an sich denkbar. Offen bleibt auch noch die Frage, in welcher Weise die beiden anderen für den Chloroplasten typischen Farbstoffe, Carotin und Xanthophyll, im Chloroplasten untergebracht sind. Der Verfasser hat die Vermutung, daß diese in Chloroplastenlipoiden gelöst sind, da getrockneten Blättern mit Petroläther, d. h. einem Lipoidsolvens, die Carotinoide ohne Chlorophyllbeimengung entzogen werden können.

Die Ausführung der vorliegenden Arbeit ist dem Verfasser durch weitgehende Unterstützung von seiten der Notgemeinschaft der Deutschen Wissenschaft ermöglicht worden, wofür dieser auch hier der Dank ausgesprochen sei.

Zusammenfassung.

Die Arbeit bezweckt die Klärung der Frage, ob die von *Willstätter* u. a. ausgesprochene Ansicht, wonach das Chlorophyll im lebenden Blatte an hochmolekulare Stoffe bzw. an Eiweiß adsorbiert oder sonstwie gebunden ist, mit der Tatsache der Rotfluoreszenz der normalen Chloroplasten in Einklang gebracht werden kann, da die Fluoreszenzeigenschaft des Farbstoffs bisher nur in organischen Lösungsmitteln nachgewiesen werden konnte, so daß *Stern* für das Vorhandensein einer lipoiden Chlorophyllösung im Chloroplasten eintritt.

1. Modellversuche mit verschiedenen Adsorbenzien.

Gelöstes, chemisch reines Chlorophyll ließ sich an zahlreiche feste Stoffe adsorbieren, so daß solche Präparate, soweit sie unter Ausschluß von Wasser hergestellt waren, zum Teil die Rotfluoreszenz des Chlorophylls bei Bestrahlung mit ultraviolettem Lichte zeigten. Besonders stark waren Adsorption und Fluoreszenz bei Anwendung von „Aluminiumhydroxyd C“ (*Willstätter*), das unter Schonung der Gelstruktur von Wasser befreit worden war. Auch Adsorbate an lipoidfreies Globin zeigten geringe Fluoreszenz. Die Fluoreszenz solcher Präparate ist nach Monaten noch unverändert.

2. Versuche mit Blättern.

Durch fraktioniertes Zentrifugieren wässeriger Blattreibgemische beliebiger Pflanzen gelang es, eine dunkelgrüne Masse zu isolieren, die größtenteils aus zerstörten Chloroplasten bestand und die sich in Wasser bei leichtem Schütteln kolloidal löste. Solche Lösungen zeigten im ultravioletten Lichte starke Rotfluoreszenz und verloren diese völlig bei Erhitzung auf etwa 70 bis 100° innerhalb 1 bis 5 Sekunden. Bei Zusatz von Schwermetallsalz oder Ammonsulfat zur frischen Lösung flockte eine dunkelgrüne, ebenfalls stark rot fluoreszierende Masse aus, die ebenfalls bei ganz kurzem Erhitzen ihre Fluoreszenz verlor. Diese muß ihrem Hauptbestandteil nach als eine Proteinsubstanz von sehr leichter Aussalzbarkeit angesprochen werden. Demnach muß die durch Erhitzung bewirkte Fluoreszenzvernichtung des Chlorophylls in den Sedimentlösungen mit einer Veränderung des Eiweißkörpers in Zusammenhang gebracht werden, und es ist anzunehmen, daß das Chlorophyll an dieses Eiweiß irgendwie locker gebunden, vermutlich ad-

sorbiert ist, beim Denaturieren des Eiweißes abgespalten und dadurch in den kolloidalen Zustand überführt wird, in dem es nicht fluoresziert.

Längeres Erhitzen der Sedimentlösungen hatte Wiederauftreten der Fluoreszenz zur Folge. Diese Erscheinung wurde auf einen Übertritt des Farbstoffs in die durch die Erhitzung flüssig gemachten Chloroplastenlipoide zurückgeführt, die Chlorophyll nachgewiesenermaßen molekulardispers zu lösen vermögen, womit das Auftreten der Fluoreszenz verbunden ist.

Proteolytische Abbauversuche mit den Sedimentlösungen führten ebenfalls zu Fluoreszenzvernichtung. Ebenso konnte an Blattschnitten die Beeinflussung der Fluoreszenz durch Erhitzung, wie sie in Sedimentlösungen gelungen war, wiederholt werden.

Demnach wird der Zustand des Chlorophylls im lebenden Blatte wohl am besten als eine Adsorption des Farbstoffs an das Chloroplasteneiweiß in monomolekularer Schicht bezeichnet.

Modellversuche zur Frage der Eisenbeteiligung an der Kohlensäureassimilation der grünen Pflanzen.

Von

Kurt Noack.

(Aus dem Botanischen Institut der Universität Erlangen.)

(Eingegangen am 13. Januar 1927.)

Die Frage nach der Beteiligung des Eisens an den Stoffwechselvorgängen hat in den letzten Jahren durch die Arbeiten von *O. Warburg*, *Baudisch* u. a. zunehmende Bedeutung erlangt. Im folgenden seien Versuche mitgeteilt, die sich auf die Möglichkeit der Eisenmitwirkung bei der Kohlensäureassimilation der grünen Pflanze beziehen und die folgende Grundlage haben:

Moore[1]) hat mikroskopisch-chemisch in den Chloroplasten Eisen nachgewiesen. *O. Warburg*[2]) zerlegt unter Zugrundelegung früherer Arbeiten von *Blakman* den Assimilationsvorgang in zwei Teile, die temperaturunabhängige, photochemische Reaktion, die bei geringer Lichtintensität unmittelbar nachgewiesen werden kann, und die „*Blakman*sche Reaktion", die eine gewöhnliche Dunkelreaktion mit starker Temperaturabhängigkeit darstellt und, soweit die Temperaturbeziehung in Frage kommt, bei höherer Lichtintensität das Bild der Gesamtreaktion bestimmt. *O. Warburg* fand ferner, daß die Kohlensäureassimilation durch Blausäure oder Schwefelwasserstoff so gehemmt wird, daß auf eine Beeinträchtigung der *Blakman*schen Reaktion durch diese Stoffe zu schließen ist, und faßt diese Hemmung wegen der Affinität der genannten Stoffe zu Schwermetallen als eine Behinderung einer beim Assimilationsvorgang beteiligten Eisenkatalyse auf. Der Verfasser[3]) fand, daß die gegenüber belichteten grünen Pflanzen besonders starke Giftwirkung der schwefligen Säure in den weiter unten zu behandelnden sekundären Folgen einer Assimilationshemmung zu suchen ist, und glaubt ebenfalls, eine irgendwie geartete

[1]) *J. Moore*, Proc. Roy. Soc. B. **87**, 556, 1914.

[2]) *O. Warburg*, Naturwiss. **13**, 985, 1925.

[3]) *Kurt Noack*, Zeitschr. f. Botanik **17**, 481, 1925. Zeitschr. f. angew. Chem. **39**, 302, 1926.

Ausschaltung des Eisens, vielleicht durch Komplexbindung an die schweflige Säure, aus dem Assimilationsvorgang annehmen zu müssen. Auch von ganz anderer Grundlage, von der Fluoreszenz des Chlorophylls im lebenden Blatte, ausgehend, kam der Verfasser zu dem Schluß, daß Schwermetalle an der Assimilation beteiligt sein müssen. Nachdem *Straub*[1]) u. a. die oxydierende Wirkung belichteter fluoreszierender Farbstoffe auf Jodkalium, Benzylalkohol usw. festgestellt hatten, wies der Verfasser[2]) nach, daß auch die physiologische („photodynamische“), von *Tappeiner* untersuchte Wirkung dieser Farbstoffe in einer Oxydationswirkung besteht, da er z. B. die hochempfindlichen Paramaecien, wie auch beliebige Pflanzenzellen, vor der photodynamischen Wirkung durch das ungiftige, neutrale Natriumsulfit schützen konnte und andererseits Zusatz von Mangansalz als Sauerstoffüberträger eine starke Erhöhung der photodynamischen Wirkung zur Folge hatte. Diese Befunde konnten des weiteren auf die Kohlensäureassimilation übertragen werden insofern, als der Verfasser (l. c., 1925) feststellte, daß das schon bekannte Absterben belichteter grüner Blätter in kohlensäurefreier Atmosphäre eben in dieser Ausschaltung des normalen Akzeptors der photochemischen Gesamtreaktion zu suchen ist, derart, daß nun der Farbstoff selbst, wie auch das Protoplasma als Endakzeptoren der Photoreaktion dienen, die auf oxydativem Wege zur Farbstoffausbleichung und Abtötung des Protoplasten führt. *Gaffron*[3]) hat neuerdings die Oxydierbarkeit natürlicher Eiweißstoffe durch belichtete fluoreszierende Farbstoffe, unter anderem durch Methylchlorophyllid, in exakten Versuchen sichergestellt.

Diese Befunde lassen sich nicht ohne weiteres für das Eindringen in den Chemismus der Kohlensäureassimilation verwerten, da diese in ihrem Gesamtverlauf nicht einen Oxydations-, sondern einen Reduktionsvorgang darstellt. Es ist jedoch zu betonen, daß die am Sauerstoffverbrauch gemessene Photooxydationsgröße des Chlorophylls in abgetöteten Blättern von der Größenordnung des normalen Assimilationswertes ist [nach den Versuchen des Verfassers (l. c.)]. In derselben Richtung liegen die Ergebnisse, über die hierauf *Gaffron*[4]) und *O. Warburg*[5]) berichteten: Die Sauerstoffübertragung durch belichtetes Chlorophyll oder Hämatoporphyrin entspricht annähernd dem *Einstein*schen photochemischen Äquivalentgesetz. So kommt auch *O. Warburg* zu der Auffassung, daß trotz der Verschiedenheit der biologischen, photochemischen Kohlensäurereduktion von den erfaßbaren Photooxydations-

---

[1]) *W. Straub*, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **51**, 383, 1904.
[2]) *Kurt Noack*, Zeitschr. f. Botanik **12**, 273, 1920.
[3]) *H. Gaffron*, diese Zeitschr. **179**, 157, 1926.
[4]) *Derselbe*, Naturwiss. **13**, 860, 1925.
[5]) *O. Warburg*, ebendaselbst **13**, 985, 1925.

vorgängen eine Beziehung zwischen den genannten Prozessen bestehen muß.

Es ist daher wohl berechtigt, die durch fluoreszierende Farbstoffe bewirkten Photooxydationen auch für die Frage der Beteiligung des Eisens an der Kohlensäureassimilation mit heranzuziehen.

Als Sauerstoffakzeptor verwandte der Verfasser das von ihm früher schon (l. c., 1925) benutzte Benzidin, das in Gegenwart von Eosin usw., wie auch — in methylalkoholischer Lösung — von Chlorophyll im Lichte zu violettbraunem Farbstoff oxydiert wird, der vermutlich zur Gruppe des Diphenochinondiimins gehört und demnach eine über das Benzidinblau hinausgehende Oxydationsstufe des Benzidins darstellt. Bei Gegenwart von etwa 8 Proz. Halogensalz kann dagegen mit Eosin in wässeriger Lösung die Benzidinblaustufe selbst erhalten werden. In beiden Fällen läßt sich durch Mangansalzzusatz die Benzidinphotooxydation beträchtlich beschleunigen. Soweit die Schwermetallwirkung in Frage steht, erlauben diese Versuche eine gewisse Vergleichung mit den Verhältnissen bei der Kohlensäureassimilation, da im Blatte schon häufig Mangan nachgewiesen worden ist. Eine engere Analogisierung war jedoch ausgeschlossen, da die für Oxydationsbeschleunigung nötige Minimalmenge an Mangan den Mangangehalt der Blätter bei weitem überschreitet. Wird z. B. eine gesättigte, wässerige Benzidinlösung mit 8 Proz. Kochsalz, $1{,}6 \,.\, 10^{-4}$ Mol Eosin (pro Liter) und Manganochlorid in verschiedenen Mengen versetzt, so tritt bei Belichtung reichliche Benzidinblaubildung nur bis herab zu einer Konzentration von $^{1}/_{200}$ Mol Mangan (pro Liter) ein, derart, daß nach oben keine Grenze gesetzt ist.

Um so mehr ist das Bestehen einer solchen Analogie beim Eisen denkbar, da, wie im folgenden beschrieben wird, schon kleine Eisenmengen dieselbe Wirkung wie große Manganmengen auf das genannte Photooxydationssystem besitzen, und zwar merkwürdigerweise so, daß größere Eisenmengen die Benzidinphotooxydation völlig hemmen.

I. Versuche mit Eosinnatrium und Benzidin in wässeriger Lösung.

a) Eisensalze.

Die Versuche wurden dadurch erleichtert, daß, genau wie beim System Eosin—Benzidin—Mangansalz, bei Ersatz des Mangans durch Eisen die Benzidinphotooxydation in Gegenwart von Halogensalz nur bis zur leicht kontrollierbaren Benzidinblaustufe führt und durch den Halogensalzzusatz gleichzeitig eine Reaktionsbeschleunigung auftritt, derart, daß starke Belichtung und Anwendung optimaler Eisenkonzentration in wenigen Minuten reichliche Benzidinblaubildung zur Folge hat.

Auch die Halogensalzwirkung ist stark von der Konzentration abhängig. Bei Anwendung von Kochsalz bewirkten Konzentrationen unter 8 Proz. keine besondere Beschleunigung der Photooxydation, während von etwa 10 Proz. Kochsalz an auch ohne Eisenzusatz geringe Benzidinblaubildung auftrat. In starkem, direktem Sonnenlicht konnte sogar ohne Eosinzusatz bei Gegenwart von mehr als 10 Proz. Kochsalz Benzidinblaubildung erreicht werden, was vielleicht in der Unmöglichkeit der Fernhaltung kleinster Schwermetallsalzmengen seinen Grund hat (vgl. die späteren Angaben über Kupferwirkung). In ähnlichem Sinne vermutet *R. Kuhn* (nach einer Mitteilung in Oppenheimer, Fermente, 1926, S. 1745), daß die eisenfreie H_2O_2-p-Phenylendiaminreaktion wenigstens teilweise durch Eisenspuren der Reagenzien bedingt ist, da sie durch Blausäure gehemmt werden kann. Wie Kochsalz wirkten auch andere Halogensalze, z. B. Magnesiumchlorid und Kaliumchlorid, ebenso Rhodankalium, das schon im künstlichen Licht ohne Eisenzusatz Benzidinblaubildung bewirkte. Es bestehen hier also Verhältnisse wie bei der α-Naphthylamin- oder Benzidinoxydation durch Wasserstoffperoxyd [*Baudisch*[1])], jedoch so, daß im vorliegenden Falle, d. h. beim Ersatz des Wasserstoffperoxyds durch belichtetes Eosin, Schwermetallzusatz wesentlich ist. Somit dürfte es sich auch hier gemäß der Annahme von *Baudisch* um die Bildung von Verbindungen höherer Ordnung unter Mitwirkung des Halogensalzes handeln so, daß Nebenvalenzkräfte zur Bindung und damit auch zur Aktivierung des zu oxydierenden Körpers zur Verfügung stehen. Nebenbei sei bemerkt, daß Benzidinchlorhydrat unter den vorliegenden Versuchsverhältnissen keine Blaubildung, sondern nur schwache Violettfärbung ergab.

Für die im folgenden zu beschreibenden Reihenversuche wurden meist Reagenzgläser mit je 2 ccm gesättigten (etwa 0,04proz.) Benzidinwassers, 2 ccm Halogensalzlösung, 1 ccm der zu untersuchenden Eisensalzlösung und 1 Tropfen Eosinnatriumlösung von bekanntem Volumen beschickt so, daß die Eosinkonzentration $1{,}6 \cdot 10^{-4}$ Mol pro Liter, die Kochsalzkonzentration 8 Proz. betrug. Die Gläser wurden dann mit einer 2000-Watt-Lampe im Abstand von 40 cm vom Glühkörper belichtet. Auf annähernd gleichmäßigen Sauerstoffgehalt der Gemische mußte Bedacht genommen werden, da, wie der Verfasser früher fand, die Photooxydation in starkem Maße, und zwar in linearer Proportion vom Sauerstoffgehalt des Lösungsmittels abhängig ist. Untersucht wurden besonders Ferroammonsulfat, Ferrolactat, Ferrobicarbonat und auch einige Ferriverbindungen. Alle angegebenen Molzahlen beziehen sich auf 1 Liter.

---

[1]) *O. Baudisch*, diese Zeitschr. **106**, 134, 1920.

1. Ferroammonsulfat. In einem Parallelversuch mit Manganochlorid wurden die Konzentrationen von $^1/_{25}$ bis $^1/_{100000}$ Mol Eisen- bzw. Mangansalz angewandt; nach einer Belichtungsdauer von 5 Minuten ergab sich folgendes:

Tabelle I.

Ferroammonsulfat		Manganochlorid	
Konz. in Mol	Reaktion	Konz. in Mol	Reaktion
$^1/_{25}$ bis $^1/_{1600}$	nur Trübung durch Abscheidung basischer Ferriverbindungen	$^1/_{25}$ bis $^1/_{50}$	stärkste Benzidinblaubildung
$^1/_{3200}$	Spur von Benzidinblau	$^1/_{100}$	etwas weniger Benzidinblaubildung
$^1/_{6400}$	reichlich Benzidinblau	$^1/_{200}$	etwas weniger als bei $^1/_{100}$
$^1/_{12800}$ bis $^1/_{25600}$	stärkste Benzidinblaubildung	$^1/_{400}$ bis $^1/_{800}$	geringe Benzidinblaubildung
$^1/_{51200}$	wenig Benzidinblau	$^1/_{1600}$	Spuren v. Benzidinblau
$^1/_{100000}$ und weniger bis 0	unverändert	$^1/_{3200}$ und weniger bis 0	unverändert

Die Dunkelkontrollen waren nach 6 Stunden vollkommen unverändert und zeigten bei Belichtung dieselben Erscheinungen wie der Hauptversuch. Bei Versuchen ohne Halogensalz trat in der Eisen- wie in der Manganreihe nur die violette, höhere Oxydationsstufe des Benzidins auf, wenn auch nur in geringem Maße. Immerhin lag auch hier in der Eisenreihe das Maximum der Reaktion bei $^1/_{10000}$ bis $^1/_{20000}$ Mol Eisensalz mit starker Hemmung in den höheren Eisenkonzentrationen im Gegensatz zur Manganreihe, bei der einfache Proportionalität herrschte. Längeres Stehenlassen der Dunkelkontrollen (24 Stunden) verschob das Maximum der Eisenwirkung nach den höheren Konzentrationen, offenbar infolge Ferrisalzbildung während des Stehens (vgl. später).

Die hemmende Wirkung höherer Eisenmengen auf die Benzidinblaubildung beruht nicht auf einer Beeinflussung des zu dehydrierenden Benzidins, da in allen Fällen nach einem sofort nach der Belichtung vorgenommenen Jodzusatz Benzidinblau in normaler Weise ausfiel. Ebensowenig kommt hierfür eine durch größere Ferroammonsulfatmengen bedingte p_H-Verschiebung in Frage, wie aus den weiter unten zu behandelnden Versuchen mit Ferrobicarbonat hervorgeht.

2. Ferrolactat wirkte in einem Parallelversuch mit Ferroammonsalz wie dieses: In beiden Fällen ergaben Mengen von $^1/_{500}$ bis $^1/_{2000}$ Mol nach einer Belichtungsdauer von 3 Minuten nur Trübung durch Eisenabscheidung. Spuren von Benzidinblau traten erst bei $^1/_{4000}$ Mol auf, während das Maximum (sehr starke Benzidinblaubildung) bei $^1/_{16000}$ bis $^1/_{32000}$ Mol lag. Deutliche, wenn auch schwache Farbstoffbildung

war noch bei $^1/_{128000}$ Mol zu erkennen. Warum die Konzentrationen optimaler Wirkung gegenüber den in Tabelle I verzeichneten Werten etwas tiefer lagen, bleibt fraglich. Vielleicht war der Sauerstoffgehalt in der vorliegenden Versuchsreihe etwas größer oder die Beleuchtungsintensität infolge Stromschwankung höher. Zu bemerken ist, daß die Eisenwirkung noch in einer Verdünnung vorhanden war ($^1/_{128000}$ Mol), in der mit Ferricyankali nach zweistündigem Stehen keine Berlinerblaureaktion auftrat. Erst mit $^1/_{32000}$ Mol konnte diese Reaktion in Form einer blaugrünen Färbung erhalten werden.

3. Sehr starke Wirkung hatten auch Ferrosalze der Kohlensäure, die mittels Durchleitens von Kohlendioxyd durch wässerige Suspensionen von chemisch reinem Eisen (*Kahlbaum*) hergestellt wurden. *Baudisch* erwähnt in seinen Studien über Eisenkatalyse unter anderem[1]), daß frische Lösungen von Ferrocarbonaten, die auf die genannte Weise hergestellt werden, imstande sind, mit Hilfe des Luftsauerstoffs Milchsäure, gewisse Eiweißbausteine usw. oxydativ stark abzubauen, während solche Lösungen, die unter Sauerstoffabschluß einige Stunden gestanden hatten, trotz der erhalten gebliebenen Fähigkeit der Sauerstoffabsorption einen oxydativen Abbau nicht mehr bewirken können. Im vorliegenden Falle kann es sich allerdings nicht um die Wirkung einer hochaktiven Eisenverbindung von kurzer Lebensdauer handeln, da diese von der Dauer des Stehenlassens der Lösungen unter Luftabschluß (6 Stunden bis 4 Tage) ziemlich unabhängig war. Es handelt sich ja hier auch um Reaktionen, die mit einer Milchsäure- oder Eiweißoxydation nicht zu vergleichen sind.

Zur Festlegung der quantitativen Beziehungen wurde der Eisengehalt von 20 ccm der jeweiligen Versuchsstammlösungen durch Eindampfen, Aufnehmen mit Schwefelsäure und Glühen gravimetrisch als Fe_2O_3 bestimmt.

Aus den Versuchen sei folgender herausgegriffen: Nach 20stündigem Durchleiten von Kohlendioxyd lag das Wirkungsmaximum (reichliche Benzidinblaubildung nach 3 Minuten Belichtung) bei $^1/_{12000}$ bis $^1/_{50000}$ Mol Eisen, während bei $^1/_{6000}$ Mol nur geringe und bei noch höheren Konzentrationen keine Reaktion außer der auch hier auftretenden Trübung durch Ferrioxydhydratbildung zu konstatieren war. Die untere Grenze der Wirksamkeit (Spuren von Benzidinblaubildung) lag bei $^1/_{100000}$ Mol. Eine Dunkelreaktion war auch hier nicht festzustellen.

Wurden Lösungen mit einem für die Benzidinblaubildung zu hohen Eisengehalt kurz erhitzt, so konnten sie sich nachher wirksam zeigen, d. h. es ist der Überschuß an zweiwertigem Eisen in unwirk-

[1]) *O. Baudisch*, Naturwiss. **13**, 749, 1925.

sames Ferrioxydhydrat überführt worden, so daß eine kleine Menge der wirksamen Verbindung erhalten geblieben war. Auch dieser Befund zeigt, daß es sich bei der Benzidinphotooxydation nicht um die Wirkung hochaktiver Eisenverbindungen von kurzer Lebensdauer im Sinne *Baudischs* handeln kann.

Die Hemmung der Benzidinphotooxydation bei Anwendung von Ferrobicarbonat bzw. -carbonatmengen über $^1/_{6000}$ Mol zeigt, daß die ungefähr bei derselben Konzentration zu konstatierende Hemmung in Gegenwart von Ferroammonsulfat oder Ferrolactat nicht auf einer p_H-Erhöhung durch photolytische Säureabspaltung beruhen kann, da es sich im vorliegenden Falle um HCO_3- bzw. CO_3-Ionen handelt. Ferner ist im Hinblick auf den biologischen Hintergrund der vorliegenden Untersuchung bedeutsam, daß auch die Kohlensäureverbindungen des Eisens in kleinsten Mengen bei photochemischen Reaktionen in Gegenwart fluoreszierender Farbstoffe wirksam sind.

4. Ferroammoncitrat zeigte andere quantitative Verhältnisse: Bezogen auf 15 Proz. Eisengehalt, lag die Zone für Blaubildung, ausgedrückt in Mol Eisen, zwischen $^1/_{250}$ und $^1/_{2000}$ Mol mit einem Maximum bei $^1/_{500}$ Mol. Jedoch war die Wirkung weit schwächer als bei den im vorigen angeführten Salzen. Bemerkenswert ist das Vorhandensein eines Optimums trotz schwacher Allgemeinwirkung.

5. *Wolff*[1]) erhielt mit kolloidalem Ferrocyaneisen Peroxydasereaktionen. Die Verbindung wurde nach den Angaben *Wolffs* aus Ferrocyankali und Ferrosulfat hergestellt, obwohl mit dem blauen Membranfilterrückstand gemäß *Wolffs* Angaben leicht Chinhydronbildung aus Hydrochinon und Wasserstoffperoxyd zu erzielen war, zeigte die Substanz im vorliegenden photochemischen System, bei den verschiedensten Konzentrationen untersucht, nur ganz schwache Wirkung.

6. Ferrocyankali war in allen Konzentrationen ohne Wirkung.

Ferner wurden einige Ferriverbindungen untersucht:

7. Ferricyankali bewirkte bis herab zu etwa $^1/_{120\,000}$ Mol Benzidinblaubildung als Dunkelreaktion. Wenn bei geringeren Mengen eine Lichtreaktion ausblieb, so ergibt der Vergleich mit den Wirkungsgrößen der oben angeführten Eisensalze, daß der Grund dieses Ausfalls wohl in der Geringfügigkeit der anwendbaren Eisenmenge zu suchen ist.

8. Anders verhielt sich Ferriammonsulfat: Bis herab zu $^1/_{2000}$ Mol trat auch hier Benzidinblaubildung als Dunkelreaktion in absteigendem Maße auf. Mengen von $^1/_{4000}$ bis $^1/_{8000}$ Mol ergaben ganz schwache Benzidinblaubildung im Lichte. Ein Maximum der Wirkung war bei

---

[1]) *J. Wolff*, Ann. Inst. Pasteur **24**, 789, 1910.



$^1/_{16000}$ bis $^1/_{32000}$ Mol gegeben. Jedoch stand die gebildete Farbstoffmenge um ein Vielfaches hinter der mit Ferroammonsulfat erhaltenen zurück. Mengen unter $^1/_{32000}$ Mol ergaben Benzidinblau nur in Spuren. Ohne Eosin war keine Photoreaktion zu erkennen.

Bemerkenswert ist, daß hier, obwohl eine Dunkelreaktion an sich möglich ist, doch zwischen der unteren Konzentrationsgrenze für diese und der oberen für die Lichtreaktion eine Konzentrationszone mit hemmender Wirkung auf die Photooxydation vorhanden ist.

9. Frisch gefälltes Ferrihydroxyd und Ferricarbonat waren ohne Wirkung.

Es ergibt sich also, daß die Ferroverbindungen in ihrem Einfluß auf die Benzidinphotooxydation in Gegenwart von fluoreszierendem Farbstoff wenigstens die hier untersuchten Ferriverbindungen bei weitem übertreffen.

10. Einige Versuche wurden mit der in der vorigen Mitteilung beschriebenen Substanz angestellt, die aus den bekanntlich eisenreichen Spinatblättern durch Zerreiben mit Wasser und wiederholtem Zentrifugieren gewonnen wurde und im wesentlichen aus desorganisierter Chloroplastenmasse besteht. Die daraus hergestellte kolloidale Lösung wurde in verschiedenen Mengen dem System Benzidin—Eosin—Kochsalz zugesetzt. In einigen Fällen war nach Belichtung leichte Benzidinblaubildung zu konstatieren, ohne daß jedoch eindeutige Ergebnisse erzielt wurden. Die Versuche werden fortgesetzt.

11. Auch das Eisen des Hämoglobins scheint eine schwache Wirkung in dem System auszuüben. Mengen von 0,01 bis 0,0012 Proz. Hämoglobin-*Merck* bewirkten nach einer Belichtungsdauer von 10 bis 20 Minuten violettblaue Färbung. Hämoglobinlösungen, durch die Sauerstoff geleitet worden war, zeigten keine stärkere Wirkung.

b) Kupfer- und Zinksalze.

Vergleichsweise wurden einige Versuche mit Kupfersalzen an Stelle des Eisens angestellt. Kupfersalze haben in Gegenwart von Halogensalz eine außerordentlich starke, sauerstoffübertragende Wirkung auf Benzidin, worauf schon *Madelung*[1]), ohne Angabe der wirksamen Minimalkonzentration, hingewiesen hat. Wurde z. B. Benzidinwasser mit Kupfersulfat bis herab zu einer Konzentration von $^1/_{400000}$ Mol versetzt, so fand auf Halogensalzzusatz sofort reichliche Benzidinblaubildung als Dunkelreaktion statt. Noch geringere Kufersalzmengen bewirkten auch nach mehrstündigem Stehen keine Benzidinblaubildung im Dunkeln, wohl aber im reichsten Maße bei Belichtung in Gegenwart

[1]) *W. Madelung*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **71**, 204, 1911.

von Eosin, und zwar so, daß nach einer Belichtungsdauer von 6 Minuten in Gegenwart von 8 Proz. Kochsalz und $1,6 . 10^{-4}$ Mol Eosinnatrium noch bei einer Kupfersulfatkonzentration von $^1/_{6\,000\,000}$ Mol deutliche Benzidinblaubildung festzustellen war und auch noch in Gegenwart von $4 . 10^{-9}$ Mol Kupfer kleinste Farbstoffmengen auftraten, die in den kupferfreien Kontrollen fehlten. Es handelt sich bei diesen Wirkungsgraden um dieselbe Größenordnung, in der nach *Titoff*[1]) Kupfersulfat die Oxydation neutralen Natriumsulfits durch den in der Salzlösung vorhandenen Sauerstoff beschleunigt. Das Maximum der Kupferwirkung lag bei der höchsten Konzentration, die, ohne eine Dunkelreaktion zu bewirken, angewandt werden konnte. Es fehlt also hier die bei den Ferrosalzen und dem, wie das Kupfersulfat Dunkeloxydation ermöglichenden, Ferriammonsulfat vorhandene Konzentrationszone, in der die Benzidinphotooxydation gehemmt wird.

Auch Zinksulfat gab in Mengen von $^1/_{150}$ Mol im System Benzidin—Eosin—Halogensalz bei Belichtung starke Benzidinblaubildung; die untere wirksame Konzentration lag bei etwa $^1/_{1500}$ Mol. Dem Wirkungsgrad nach schließt sich also das Zink dem Mangan an, jedoch bewirkten im Gegensatz zum Mangan Mengen über $^1/_{150}$ Mol Hemmung der Farbstoffbildung, die wohl auf p_H-Einflüsse zurückzuführen ist, da das gegenüber dem Zinksulfat stärker saure Zinkchlorid überhaupt keine Wirkung hatte.

II. Der Charakter der Eisen- und Kupferwirkung im belichteten System Eosin — Benzidin — Halogensalz.

Die im vorigen beschriebenen Reaktionen gleichen am meisten der Wirkung von Wasserstoffperoxyd auf Benzidin in Gegenwart von Schwermetallsalz, die besonders *Madelung*[2]) untersucht hat. Unter Annahme einer engeren Verwandtschaft der hier beschriebenen Benzidinphotooxydation mit der gewöhnlichen Wasserstoffperoxydreaktion auf Benzidin wäre belichtetes Eosin dem Wasserstoffperoxyd gleichzusetzen, obwohl noch eine andere Möglichkeit denkbar ist, auf die weiter unten eingegangen werden soll.

Auf alle Fälle war die Frage zu entscheiden, ob die Beteiligung der Eisen- und Kupfersalze an der Lichtreaktion als echt katalytische oder als induzierte zu betrachten ist. *Madelung* fand, daß bei der Wasserstoffperoxyd-Benzidinreaktion Eisensalz als Induktor, Kupfersalz als Katalysator wirkt. *Titoff* (l. c.) betrachtet andererseits die beschleunigende Wirkung von Ferrosulfat auf die Natriumsulfitoxydation durch molekularen Sauerstoff trotz Verbrauch des Eisens

[1]) *A. Titoff*, Zeitschr. f. physikal. Chem. **45**, 641, 1903.
[2]) *W. Madelung*, l. c.; Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **44**, Ib, 626, 1911.



nicht als Induktion, sondern als Katalyse, da auf 1 Mol Ferrosulfat mehr als 100 Mol Sulfit umgesetzt werden. Um so mehr sind die bekannten Cystinoxydationen *O. Warburgs* durch Eisen als echte katalytische Vorgänge aufzufassen, ebenso die photooxydativen Spaltungen von Zuckern, Aminosäuren usw. durch Schwermetallsalze, über die *C. Neuberg*[1]) früher berichtet hat. Hingegen ist nach *Kuhn*[2]) die Beteiligung von Ferrosalz bei der Reaktion von Wasserstoffperoxyd auf Jodwasserstoff stöchiometrischer Art.

Außerdem war es erwünscht, die Temperaturabhängigkeit der Benzidinphotooxydation unter den gegebenen Bedingungen zu prüfen.

Die Bestimmung des Benzidinblaus wurde jodometrisch auf Grundlage der Methode von *Madelung* vorgenommen. Die Anwesenheit des Eisensalzes stört bei raschem Arbeiten und Abkühlen der zu titrierenden Lösung nicht, obwohl das Eisen im Benzidinblauniederschlag qantitativ enthalten ist. Die Belichtung der Versuchslösungen wurde in einer flachen, kreisrunden Glaskammer, die mit zwei gegenüberliegenden Hähnen an den Schmalseiten versehen war und 174 ccm Inhalt hatte, vorgenommen, so daß die Kammer mit der Versuchslösung unter Vermeidung von Luftblasen vollständig gefüllt war. Die Versuchsgemische wurden in Mengen von 200 ccm in molaren Konzentrationen angesetzt, so daß sich nach dem Einfüllen in die Kammern die darin befindlichen absoluten Mengen des Eisens usw. berechnen ließen. Zur Titration wurde die gesamte entstandene Benzidinblaumenge verwandt. Während der Belichtung befanden sich die Kammern in einem Glastrog mit Wasser von konstanter Temperatur (10^0). Die in den Kammern befindliche Benzidinmenge betrug jeweilig 0,04 g neben 8 Proz. Kochsalz und $1{,}6 \,.\, 10^{-4}$ Mol Eosin pro Liter.

a) Wurde eine solche Lösung in Gegenwart von 0,87 ccm n/100 Ferroammonsulfat, entsprechend $^1/_{20\,000}$ Mol Eisen pro Liter 4 Minuten belichtet, so ergab die Titration des Benzidinblaus nach Jodzusatz in drei Parallelversuchen einen Verbrauch von 1,84, 1,82 und 1,87 ccm n/100 Natriumthiosulfat. Bei längerer Belichtung stieg die Farbstoffmenge nur unwesentlich an. Da durch die starke Benzidinblaubildung die Lichteinstrahlung natürlich fortlaufend geschwächt wurde, lassen sich keine klaren Beziehungen zwischen Belichtungsdauer und entstandener Farbstoffmenge herstellen.

Bei Zusatz von 0,43 ccm n/100 Ferroammonsulfat, entsprechend $^1/_{40\,000}$ Mol Eisen pro Liter, betrug der Thiosulfatwert 1,64 ccm n/100 nach 4 Minuten Belichtung.

---

[1]) *C. Neuberg*, diese Zeitschr. **13**, 305, 1908; **23**, 279, 1910; **29**, 279, 1910.
[2]) *R. Kuhn*, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **59**, 2370, 1926.

Aus den angegebenen Zahlen erhellt jedenfalls so viel, daß die Beschleunigung der Benzidinphotooxydation durch Eisen in Gegenwart von Eosin eine induzierte Reaktion ist. Dies ergibt sich auch aus folgendem: Nach einer Belichtungsdauer von 6 bis 8 Minuten war im Filtrat vom Benzidinblauniederschlag weder Ferri- noch Ferrosalz nachweisbar, während die salzsaure Lösung des Farbstoffniederschlags starke Reaktion mit Ferrocyankalium, keine jedoch mit Ferricyankalium gab, dagegen war die Lösung des Benzidinblauniederschlags frei von Ammoniak und Schwefelsäure, die sich beide im Filtrat vom Farbstoffniederschlag, nachgewiesen mit Bariumchlorid und *Neßlers* Reagens, befanden. Somit ist das Ferroammonsulfat durch die Belichtung völlig aufgespalten und das Eisen unter vollständiger Oxydation vom entstandenen Benzidinblau adsorbiert worden, wie auch *Madelung* bei seinen Versuchen Adsorption des Eisens an das Benzidinblau festgestellt hat.

Die oben angeführten zahlenmäßigen Beziehungen zwischen Farbstoffbildung und zur Verfügung stehender Eisenmenge unterscheiden sich von den Werten, die *Madelung* im System Wasserstoffperoxyd—Benzidin—Ferroammonsulfat gefunden hat, insofern als im letzten Falle der Thiosulfatwert zur angewandten Eisenmenge im Verhältnis 1 : 1 stand, während bei der hier untersuchten Photooxydation auf 1 Mol Eisen 2 bis 4 Mol Benzidinblau gebildet worden sind. Dieser Unterschied kann darin begründet sein, daß die photooxydative Benzidinblaubildung, als Gesamtreaktion betrachtet, langsamer als die Farbstoffbildung durch Wasserstoffperoxyd verläuft, die eine Momentreaktion darstellt. Nach *Scrabal*[1]) ist bei Induktionsreaktionen der Betrag des nach der sekundären Reaktion erfolgenden Umsatzes um so größer, je geringer die Geschwindigkeit des Gesamtvorgangs ist.

Die Untersuchung der Kupferwirkung ergab erwartungsgemäß, daß es sich hier um eine echte Katalyse handelt: Das System Eosin—Benzidin—Kochsalz wurde unter Zusatz von $^1/_{800\,000}$ Mol Kupfersulfat 4 Minuten belichtet, wobei sich eine Benzidinblaumenge bildete, die einem Thiosulfatwert von 2,86 ccm n/100 entsprach.

Ein prinzipieller Unterschied zwischen der Eisen- und der Kupferwirkung wird wohl nicht bestehen, da eine gekoppelte Reaktion in eine katalytische übergehen kann (vgl. *Luther* und *Schilow*[2]).

Nebenbei wurde untersucht, ob sich Eisen und Kupfer im vorliegenden System gegenseitig beeinflussen. Angewandt wurden Kombinationen von $^1/_{400\,000}$ Mol Kupfersulfat mit $^1/_{15\,000}$ und $^1/_{30\,000}$ Mol Ferroammonsulfat; es ergab sich weder eine addierende, noch eine

---

[1]) *A. Scrabal*, Zeitschr. f. Elektrochem. **11**, 653, 1905.

[2]) *R. Luther* und *N. Schilow*, Zeitschr. f. physikal. Chem. **46**, 777, 1903.

potenzierende Wirkung der beiden Schwermetallsalze aufeinander; lediglich eine leichte Hemmung der Kupferwirkung durch das Eisensalz war feststellbar.

b) Die Temperaturabhängigkeit der Reaktionen wurde bei 10 und 20° bei einer Belichtungsdauer von 4 Minuten bestimmt, wie folgende Thiosulfatwerte (n/100) zeigen:

Tabelle II.

Temperatur °C	Ferroammonsulfat 1/20 000 Mol pro Liter ccm	Kupfersulfat 1/800 000 Mol pro Liter ccm
10	1,84	2,68
20	1,87	2,75

Somit ist der Temperaturquotient gleich 1 und folgt also der für Photoreaktionen gültigen Regel. Es sei jedoch darauf hingewiesen, daß *Kuhn* und *Brann*[1]) neuerdings für die katalatische Häminwirkung, eine Dunkelreaktion, $Q_{10} = 1{,}05$ fanden.

Bei Versuchen dieser Art, die nicht wie die obigen in vollständig mit der Versuchslösung gefüllten Kammern vorgenommen wurden, trat bei Temperaturerhöhung Sinken der Reaktionsgeschwindigkeit ein, die ihren Grund nur in der Verminderung des Sauerstoffgehalts der Lösung durch die höhere Temperatur haben kann. Versuchslösungen, die 3 Stunden unter der Luftpumpe gestanden hatten, ergaben nur Spuren von Benzidinblau bei Belichtung.

Bei den Versuchen in den vollständig gefüllten Kammern, wie übrigens auch in den Reagenzglasversuchen bei Luftgegenwart, färbte sich bei der Belichtung die Lösung in allen Teilen gleichmäßig blau, wodurch erwiesen ist, daß es sich um eine Reaktion im homogenen Medium auf Kosten des im Wasser gelösten Sauerstoffs handelt.

Vorbelichtung der reinen Benzidinlösung hatte eigentümlicherweise vorübergehende Schwächung der Reaktion mit Eosin und Eisen zur Folge, was noch näher zu untersuchen ist.

Die Hauptergebnisse der bisher beschriebenen Versuche sind folgende: Die Benzidinphotooxydation durch Eosin kann durch Eisensalze ebenso wie durch Mangansalze beschleunigt werden. Zwischen der Wirkung der beiden Schwermetalle besteht jedoch der Unterschied, daß Eisen im Vergleich zum Mangan nur in ganz kleinen Mengen wirksam ist, ja, daß Eisenmengen, die immer noch unter der wirksamen Minimalkonzentration der Mangansalze liegen, spezifisch hemmend

[1]) *R. Kuhn* und *L. Brann*, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **59**, **2370**, **1926**.

auf die Benzidinphotooxydation einwirken. Kupfersalze sind noch viel wirksamer als Eisensalze.

Der Verfasser wurde durch die Herren *Pohl*-Göttingen und *Gudden*-Erlangen darauf hingewiesen, daß die Verhältnisse bei der Phosphoreszenzaktivierung der Erdalkali- und Zinksulfidphosphore ähnlich liegen. *Tiede* und *Reinicke*[1]) fanden z. B. beim Zinksulfid phosphoreszenzaktivierende Wirkung durch geringe Eisenmengen derart, daß ein Eisengehalt von 1 : 1000 schon einen phosphoreszenzvernichtenden Überschuß darstellt. *Tomaschek*[2]) findet bei Zinksulfidphosphor Schwermetallspuren ausschlaggebend für die Phosphoreszenz, und zwar wirkte Kupfer schon in kleinsten Mengen (0,006 mg Kupfer pro Gramm Zinksulfid) während Mangan mit 0,03 mg noch ganz unwirksam war und ein Maximum der Phosphoreszenz bei 17 mg, jeweils pro Gramm Zinksulfid, bewirkte. Wichtig ist außerdem, daß *Tomaschek* die auffallend günstige Wirkung von Halogensalzzusatz auf den Phosphoreszenzeffekt betont, wie dies ja auch bei den hier beschriebenen photochemischen Systemen der Fall ist.

Es scheinen also hier Zusammenhänge prinzipieller Art gegeben zu sein.

Auch eine biologische Analogie zu den obigen Unterschieden in der Wirkung der Eisen- und Mangansalze ist vorhanden: *Uspenski* und *Uspenskaja*[3]) fanden, daß Volvoxkulturen in Gegenwart von 0,3 Proz. Mangansulfat nach 7 Tagen zugrunde gingen, während schon 0,007 Proz. Ferrioxyd[4]) genügten, um diese Grünalge in derselben Zeit abzutöten und noch kleinere Eisenmengen (0,0005 Proz.) Ferrioxyd[4]) zu optimalem Gedeihen unbedingt erforderlich waren. Demnach dürften die sogenannten „Staubreaktionen“ [vgl. z. B. *Rice*[5])] auch eine Erklärung für das Absterben besonders empfindlicher Kulturen, die unbedeckt der Luft ausgesetzt sind, bieten, d. h. oligodynamische Wirkungen der in der Luft nachweisbaren Schwermetallspuren hier wie auch in anderen Fällen in Frage kommen.

III. Versuche mit Chlorophyll und Benzidin.

Um die obigen Befunde auf die photooxydative Wirkung des Chlorophylls übertragen zu können, wurde im allgemeinen 90proz. Methylalkohol als Lösungsmittel verwandt, da sich das Chlorophyll nur in organischen Flüssigkeiten molekulardispers und damit fluo-

---

[1]) *E. Tiede* und *H. Reinicke*, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **56**, 666, 1923.

[2]) *R. Tomaschek*, Ann. d. Phys., 4. F., **65**, 189, 1921.

[3]) *E. E. Uspenski* und *W. J. Uspenskaja*, Zeitschr. f. Botanik **17**, 273, 1925.

[4]) Zugesetzt als Ferricitrat.

[5]) *F. O. Rice*, Journ. Amer. Chem. Soc. **48**, 2099, 1926.

reszierend löst und die in Betracht kommenden Eisensalze sich in dieser Alkoholkonzentration noch hinreichend auflösten. Die angewandte Benzidinmenge betrug 0,3 Proz.; von Halogensalzzusatz mußte Abstand genommen werden. Das in diesem Falle durch fluoreszierende Farbstoffe erzielbare Benzidinphotooxydationsprodukt besteht, wie der Verfasser schon früher (l. c., 1925) feststellte, in braunem Farbstoff. der erst nach längerer Belichtung, als sie für die Benzidinphotooxydation in wässeriger Lösung bei Halogensalzzusatz nötig ist, in größerer Menge auftritt. Die Versuchsanordnung entsprach der im ersten Teile beschriebenen; jedoch kamen je 10 ccm der Lösungen zur Untersuchung.

Wie in den Versuchen mit wässeriger Benzidinlösung waren auch hier bestimmte Eisenmengen maximal wirksam, lagen jedoch etwas höher.

Vorversuche mit Eosin ergaben folgendes: Bei Anwendung von Ferroammonsulfat oder Ferrolactat lag das Maximum der Braunfärbung nach einer Belichtungsdauer von 60 Minuten bei $^1/_{6400}$ Mol: die Wirkungsgrenzen lagen bei $^1/_{400}$ bzw. $^1/_{25000}$ Mol. Bei Anwendung einer Alkoholkonzentration von 65 Proz. trat statt der rotbraunen Farbe Violettfärbung auf.

Ebenso verliefen Versuche mit Chlorophyll an Stelle des Eosins, wobei reines Chlorophyll $a + b$ in der Konzentration 1 : 50000 zur Verwendung kam. In einem Versuch mit Ferrolactat war nach halbstündiger Belichtung in den Lactatkonzentrationen von $^1/_{800}$ Mol an abwärts Bräunung zu erkennen, die am stärksten bei $^1/_{6400}$ Mol war. Nach längerem Belichten — weitere $1\frac{1}{4}$ Stunden — waren die Portionen mit $^1/_{200}$, $^1/_{400}$ und $^1/_{800}$ stark braun gefärbt, und zwar weit stärker als die Portionen mit geringerem Eisengehalt. Die eisenfreien, aber chlorophyllhaltigen Kontrollen, die nach halbstündiger Belichtung nur schwach hellbraun gefärbt waren, hatten sich bei Fortsetzung der Belichtung ebenfalls stärker angefärbt. Jedoch ergab ihr kolorimetrischer Vergleich mit der $^1/_{200}$ Mol Eisen enthaltenden Portion, daß in dieser etwa viermal mehr Farbstoff gebildet worden war. Benzidinfreie Kontrollen, die nur Eisen und Chlorophyll enthielten, zeigten keine Farbstoffbildung während der gesamten Belichtungsdauer.

Die untere Methylalkoholgrenze für deutliche Chlorophyllwirkung lag in Gegenwart von $^1/_{6400}$ Mol Ferrolactat bei 60 Proz.

Mit Ferrobicarbonatlösung (vgl. ersten Teil) ließ sich in Gegenwart von Chlorophyll schon nach 5 Minuten Belichtung deutliche Braunfärbung erreichen. Auch hier war bei Anwendung höherer Konzentrationen, die jedoch nicht bestimmt wurden, eine gewisse Hemmung der Benzidinphotooxydation zu beobachten.

Wenn auch diese Versuche durch die Notwendigkeit der Verwendung von Methylalkohol etwas getrübt sind, so beweisen sie doch

so viel, daß Eisen als Beschleuniger der Photooxydation des Benzidins durch Chlorophyll wirkt, d. h. daß im Prinzip eine Beteiligung des Eisens an photochemischen Reaktionen mit Chlorophyll als Sensibilisator möglich ist.

IV. Die Hemmung der Schwermetallsalzwirkung durch Cyankalium und saures Natriumsulfit.

Um noch weitere Analogien zwischen dem System fluoreszierender Farbstoff—Benzidin—Eisen und dem Assimilationsapparat zu finden, wurden Versuche mit Stoffen ausgeführt, deren starke assimilationshemmende Wirkung theoretisch gemäß dem in der Einleitung Gesagten auf Abbindung des Chloroplasteneisens zurückgeführt werden kann, womit die Möglichkeit einer eventuellen Mitwirkung von Eisen außerhalb der Chloroplasten nicht abgelehnt werden soll.

Zur Verwendung kamen Cyankalium und saures Natriumsulfit. Eine gewisse Schwierigkeit bestand dabei insofern, als durch diese Salze die p_H-Verhältnisse des Systems geändert werden und eine Pufferung nicht möglich war, da die zur Einstellung des Neutralpunkts geeigneten Puffersysteme die Eisenwirkung bei der Photooxydation an sich schon hemmten. Aus den Ergebnissen wird jedoch hervorgehen, daß die Ursache der mit den beiden Salzen tatsächlich erreichbaren Hemmung der Eisenwirkung nicht in einer p_H-Änderung zu suchen ist.

A. Versuche mit saurem Natriumsulfit.

Die Sulfitwirkung wurde z. B. in folgendem System untersucht: 0,02 Proz. Benzidin + 8 Proz. Kochsalz + $^1/_{20\,000}$ Mol Ferroammonsulfat + $1{,}6 \cdot 10^{-4}$ Mol Eosin (Mole pro Liter). Bei einer Belichtungsdauer von 2 Minuten bewirkten $^1/_{100}$ bis $^1/_{1600}$ Mol Sulfit pro Liter völlige Hemmung der Benzidinblaubildung; in der Zone von $^1/_{3200}$ bis $^1/_{50\,000}$ Mol stieg die Benzidinblaubildung mit abnehmender Sulfitkonzentration derart, daß bei $^1/_{20\,000}$ Mol etwa $^1/_5$ und bei $^1/_{50\,000}$ Mol etwa $^3/_4$ der in der sulfitfreien Kontrolle gebildeten Farbstoffmenge vorhanden war. Dieselben relativen Unterschiede waren nach viertelstündiger Belichtung vorhanden, wobei bis herab zu $^1/_{1600}$ Mol Sulfit die vollständige Hemmung erhalten blieb, die übrigen Portionen dagegen eine leichte Vermehrung der Farbstoffmenge aufwiesen.

Versuche mit Ferrolactat und Ferrobicarbonat hatten im Prinzip dasselbe Ergebnis.

Aus dem allmählichen Übergang von vollständiger Hemmung bis zur normalen Farbstoffbildung gemäß der Sulfitdosierung ergibt sich, daß keine strengen stöchiometrischen Beziehungen bestehen. Immerhin zeigte ein Vergleichsversuch mit $^1/_{10\,000}$ und $^1/_{20\,000}$ Mol Ferroammonsulfat völlige Hemmung durch $^1/_{1800}$ Mol Sulfit gegenüber $^1/_{20\,000}$ Mol

Eisen, während dieselbe Sulfitmenge bei dem höheren Eisengehalt noch schwache Benzidinblaubildung zuließ. Die untere Grenze für starke Hemmung lag gegenüber der höheren Eisenkonzentration bei $^1/_{20000}$ Mol Sulfit, gegenüber der schwächeren bei $^1/_{30000}$ Mol.

Bemerkenswert ist, daß Sulfitkonzentrationen, die drei- bis fünfmal geringer als die Eisenmengen waren, noch partielle Hemmung verursachten. Ähnlich fanden *Wieland*, *Wingler* und *Rau*[1]), daß die sauerstoffübertragende Wirkung metallischen Kupfers schon durch sehr wenig Blausäure, die stöchiometrisch nicht ins Gewicht fällt, gehemmt wird.

Andererseits ergab sich eine gewisse stöchiometrische Beziehung bei vergleichsweiser Verwendung von Eisen und Mangan, das, wie früher betont, erst bei bedeutend höherer Konzentration die Benzidinblaubildung im Lichte zu beschleunigen vermag. In einem Parallelversuch wurde die Sulfitwirkung auf $^1/_{20000}$ Mol Ferroammonsulfat und $^1/_{50}$ Mol Manganochlorid mit dem in Tabelle III enthaltenen Ergebnis untersucht:

Tabelle III.

Photooxydationsbeschleuniger:	Ferroammonsulfat $^1/_{20000}$ Mol pro Liter	Manganochlorid $^1/_{50}$ Mol pro Liter
Minimale Sulfitmenge für starke Hemmung (Spuren von Benzidinblau)	$^1/_{32000}$ Mol $NaHSO_3$	$^1/_{6000}$ Mol $NaHSO_3$
Sulfitmenge für eben erkennbare Hemmung .	$^1/_{128000}$ Mol $NaHSO_3$	$^1/_{32000}$ Mol $NaHSO_3$

Dieser Versuch zeigt zugleich, daß die Sulfithemmung unter den gegebenen Bedingungen nicht auf p_H-Einflüssen beruht, da die Sulfitmenge, die im System mit Eisen Hemmung der Blaubildung bewirkte, bei Gegenwart von Mangan die Benzidinphotooxydation normal zuließ. Dies geht auch daraus hervor, daß in anderen Versuchen das sauer reagierende, primäre Natriumphosphat erst in einer Konzentration von $^1/_{6400}$ Mol und mehr die Eisenwirkung hemmte. Außerdem erhellt aus dem Versuch der Tabelle, daß eine Ablenkung der Photooxydationsenergie des Eosins auf das Sulfit selbst höchstens zum Teil in Frage kommen kann. Der Verfasser hatte früher (l. c., 1920) festgestellt, daß belichtetes Eosin auch ohne Schwermetallzusatz die Oxydation neutralen Sulfits stark beschleunigt.

Immerhin wurden, um eine gewisse Analogie zu der gegenüber dem neutralen Sulfit bedeutend gesteigerten biologischen Giftwirkung des sauren Sulfits zu erhalten, einige Versuche mit neutralem Sulfit angestellt:

[1]) *H. Wieland, A. Wingler* und *H. Rau*, Ann. d. Chem. **434**, 185, 1923.

Tabelle IV.

Photooxydationsbeschleuniger:	Ferroammonsulfat $^1/_{20\,000}$ Mol pro Liter	Manganochlorid $^1/_{50}$ Mol pro Liter
Minimale Sulfitmenge für starke Hemmung (Spuren von Benzidinblau)	$^1/_{16\,000}$ Mol Na_2SO_3	$^1/_{2000}$ Mol Na_2SO_3
Sulfitmenge für eben erkennbare Hemmung .	$^1/_{64\,000}$ Mol Na_2SO_3	$^1/_{8000}$ Mol Na_2SO_3

Die hemmende Wirkung des neutralen Sulfits steht also hinter der des sauren beträchtlich zurück, was sich wohl am besten durch eine stärkere Affinität des sauren Sulfits zu Schwermetallen erklärt. Vielleicht besteht die Wirkung des neutralen Sulfits lediglich in einer Verdrängung des Akzeptors Benzidin, was die oben erwähnten früheren Ergebnisse des Verfassers wahrscheinlich machen.

Es ist noch darauf hinzuweisen, daß die Hemmung durch saures Sulfit auch nicht auf einem primären Angriff auf das Benzidin beruhen kann, da Zusatz von 1 Tropfen n/10 Jodlösung zu den Gemischen mit maximal $^1/_{3200}$ Mol saurem Sulfit normale Benzidinblaubildung gab. Immerhin dürften in dem ziemlich komplizierten System manche Teilreaktionen nebeneinander hergehen.

Ein Versuch, durch Stehenlassen von Eisensalz mit Sulfit vor der Belichtung eine Abbindung und damit etwa eine Herabsetzung der wirksamen Sulfitdosis zu erzielen, hatte keinen Erfolg.

Die vorgetragenen Ansichten finden darin eine gewisse Bestätigung, daß auch die beschleunigende Wirkung des Kupfers durch Sulfit gehemmt werden kann, und zwar durch Mengen, die unter den für die Eisenhemmung nötigen liegen. Bei Anwendung von $^1/_{400\,000}$ Mol Kupfersulfat hemmten $^1/_{20\,000}$ Mol saures Natriumsulfit die Benzidinblaubildung vollständig; $^1/_{40\,000}$ bis $^1/_{400\,000}$ Mol Sulfit hemmten um etwa 80 bis 90 Proz., und erst $^1/_{600\,000}$ Mol Sulfit ließ normale Farbstoffbildung zu.

B. Versuche mit Cyankali.

Auch Cyankali hatte eine Hemmung der Eisenwirkung in dem hier untersuchten System zur Folge. In Gegenwart von $^1/_{10\,000}$ Mol Ferroammonsulfat hemmte $^1/_{10\,000}$ und auch noch $^1/_{12\,000}$ Mol Cyankalium die Benzidinblaubildung fast vollständig, während bei $^1/_{20\,000}$ Mol schon normale Farbstoffbildung vorhanden war; bei Anwendung von $^1/_{30\,000}$ Mol Eisen war die Hemmung durch $^1/_{10\,000}$ Mol Cyankalium vollständig. Auch hier lassen die Unterschiede in den quantitativen Beziehungen bei Anwendung von Mangan und Kupfer an Stelle von Eisen auf eine spezifische Wirkung des Cyankaliums auf das Schwer-

metall schließen: $^1/_{50}$ Mol Manganochlorid wurde durch minimal $^1/_{3000}$ Mol Cyankali, $^1/_{200}$ Mol Manganochlorid durch minimal $^1/_{6500}$ Mol völlig gehemmt. Immerhin ist auffallend, daß bei Anwendung von $^1/_{400000}$ Mol Kupfersulfat völlige Hemmung erst durch die relativ hohe Cyankalikonzentration von $^1/_{5000}$ Mol bewirkt wurde.

Die Versuche zeigen jedenfalls so viel, daß bei den hier behandelten photochemischen Reaktionen, die als Modellversuche für die Lichtreaktionen im Chloroplasten gedacht sind, Verhältnisse vorliegen wie sie bei den als Dunkelreaktion vor sich gehenden Eisenkatalysen *O. Warburgs* gegeben sind.

Die Tatsache, daß unter Umständen die zur Hemmung der Schwermetallwirkung nötige Sulfitmenge beträchtlich unterhalb der vorhandenen Schwermetallmenge liegt, kann mit der von *O. Warburg* nachgewiesenen Reversibilität der physiologischen Blausäurewirkung in Beziehung gebracht werden, insofern als die Einwirkung der genannten Stoffe auf Schwermetall offenbar nicht in einer Bildung von Verbindungen höherer Ordnung nach der gewöhnlichen Art besteht; es dürften nur sehr lockere Anlagerungen besonderer Art in Frage kommen.

Theoretisches über die Beziehung zwischen Fluoreszenz und photochemischer Wirkung.

So augenfällig die zwangsläufige Verbindung zwischen der Fluoreszenz der organischen Farbstoffe und deren photooxydativer Wirkung im sichtbaren Lichte ist[1]), so dunkel sind noch die tieferen Ursachen dieses Zusammenhangs. Die Feststellung von *Neuberg* und *Galambos*[2]), wonach unter den von ihnen untersuchten fluoreszierenden, organischen Farbstoffen nur die Anthracenderivate neben der biologischen, „photodynamischen" Wirkung auch Spaltung chemischer Substrate bewirken. würden wohl unter Hinzuziehung der eingangs erwähnten, späteren Befunde von *Gaffron* einen Wegweiser für weiteres Vordringen in dieser Frage abgeben.

Eine wichtige Feststellung, die zu den hier mitgeteilten Ergebnissen in reziprokem Verhältnis steht, machte *Kautsky*[3]); es gelang ihm, fluoreszierende Farbstoffe, wie Rhodamin, Echtsäureeosin und andere, zur Chemilumineszenz zu bringen, indem er diese Farbstoffe an die aus dünnsten Lamellen bestehenden Kristalle einer oxydablen Siliciumverbindung (Siloxen) adsorbieren konnte, so daß die Adsorbate die Fluoreszenz des betreffenden Farbstoffs zeigten und bei Oxydation des

[1]) Vgl. hierzu die Ausführungen des Verfassers, l. c. 1925.
[2]) *C. Neuberg* und *A. Galambos*, diese Zeitschr. **61**, 315, 1914.
[3]) *H. Kautsky*, Zeitschr. f. physikal. Chem. **120**, 230, 1926.

Siloxens mit Kaliumpermanganat starkes Reaktionsleuchten aufwiesen, das mit dem Fluoreszenzspektrum des Farbstoffs übereinstimmte. Es ist also in diesem Falle gegenläufig zu den hier mitgeteilten Befunden, aus der Siloxenoxydation stammende freie Energie auf den Farbstoff übertragen und in Strahlungsenergie umgewandelt worden.

Im besonderen interessiert hier die Beteiligung der Schwermetallsalze an der photochemischen Oxydation. Möglich ist, daß diese als Sauerstoffüberträger peroxydischen Sauerstoffs wirken, dessen Entstehung irgendwie mit der Belichtung fluoreszierender Farbstoffe zusammenhängt. Eine solche Peroxydbildung wird von *Gebhard*[1]) vertreten, der sogar festes Farbstoffperoxyd durch Belichtung hergestellt haben will; *Weigert*[2]) konnte Wasserstoffperoxyd bei der Belichtung von Chininsulfat nachweisen. Auch der Verfasser[3]) hat diese Möglichkeit früher theoretisch ins Auge gefaßt, betonte aber, in Übereinstimmung mit *Weigert*, daß die Wirkung belichteter, fluoreszierender Farbstoffe die des Wasserstoffperoxyds übersteigt.

Eine andere Erklärungsmöglichkeit gibt die Annahme, daß durch den belichteten fluoreszierenden Farbstoff sowohl der Akzeptor, im vorliegenden Falle Benzidin, als auch besonders das Schwermetall in angeregten Zustand überführt wird, so daß eine Reaktion mit molekularem Sauerstoff möglich wird. *Baudisch*[4]) führt die physiologische Wirkung radioaktiver Mineralwässer auf das Vorhandensein kurzlebigen, vielleicht durch Radiozerfall aktivierten Eisens zurück. Ferner sind hier die Versuche *Neubergs*[5]), der mit belichteten Eisensalzen oxydative Spaltungen erhielt, zu erwähnen, wenn auch hierbei eine unmittelbare Lichtwirkung auf das Eisen vorliegt. Andererseits hat der Verfasser früher (l. c., 1920) festgestellt, daß den Schwermetallsalzen keine physiologische, „photodynamische" Wirkung auf Paramaecien nach Art der Eosinwirkung zukommt.

Man kann so vielleicht zu folgender Vorstellung gelangen: Die Schwermetalle können durch Strahlung wie auch durch belichtete fluoreszierende Farbstoffe aktiviert werden. Die Art der Aktivierung kann verschieden sein. Insbesondere ist die in Gegenwart von fluoreszierenden Farbstoffen im Lichte entstehende aktive Form zur Förderung von Reaktionen befähigt, die wie die hier untersuchte

---

[1]) *K. Gebhard*, Zeitschr. f. angew. Chem. **22**, 2484, 1909; **23**, 820, 1910.

[2]) *Fr. Weigert*, Nernstfestschrift 464. Halle 1912.

[3]) l. c. 1920 und 1925.

[4]) *O. Baudisch*, Arch. f. Balneologie **1**, 1, 1925; Naturwiss. **13**, 749, 1925; *O. Baudisch* und *L. Welo*, Journ. of Biol. Chem. **64**, 771. 1925. Vgl. hierzu *L. Fresenius* und *K. Harpuder*, Klin. Wochenschr. **5**, 2304, 1926.

[5]) *C. Neuberg*, diese Zeitschr., u. a. **29**, 293, 1910.

Benzidinblaubildung in ihrem Endeffekt einer Wasserstoffperoxydreaktion gleichen.

Diese Vorstellungen würden eine Bestätigung finden, wenn es gelänge, in dem System Eosin—Benzidin—Eisen das mit sichtbarem Licht bestrahlte Eosin durch kurzwellige Strahlung zu ersetzen, was der Verfasser zu untersuchen gedenkt.

Rückblick.

Die vorliegenden Untersuchungen waren in der Absicht unternommen worden, zwei Eigentümlichkeiten des Assimilationsapparats, die Fluoreszenz des Chlorophylls und das Vorkommen von Eisen im Chloroplasten, zur Behandlung der Frage nach dem Chemismus der Photosynthese mit heranzuziehen. Im folgenden soll nun kurz das Für und Wider eines solchen Versuchs beleuchtet werden. Folgende Punkte sind einer theoretischen Angleichung der Modellversuche mit Benzidin an die Verhältnisse bei der Kohlensäureassimilation günstig:

1. Die Größenordnung der durch Chlorophyll erreichbaren Photooxydation im sichtbaren Lichte entspricht der Assimilationsgröße der lebenden Zelle, wie in der Einleitung ausgeführt wurde.

2. Die photooxydative Wirkung des Chlorophylls kann durch Eisen, das im Chloroplasten vorhanden ist, stark gesteigert werden. Von Bedeutung ist vielleicht hierbei, daß auch Ferrocarbonate, deren Vorkommen im Chloroplasten ohne weiteres denkbar ist, diese Wirkung besitzen, und daß diese Verbindungen nach den Untersuchungen von *Baudisch* ganz besonders ausgeprägte physiologische Wirkungen im aktivierten Zustande besitzen.

3. Die beschleunigende Wirkung des Eisens auf die Photooxydation des Benzidins kann gerade durch solche Stoffe unterbunden werden, die schon in kleinsten Mengen eine Hemmung der Kohlensäureassimilation bewirken.

4. Im lebenden Blatte tritt nach irgendwelcher Assimilationssistierung, sei es z. B. durch Kohlensäureentzug oder Sulfitvergiftung bei währender Belichtung eine Abtötung des Protoplasmas und Ausbleichung des Chlorophylls auf, die sich nur durch die photooxydative Wirkung des fluoreszierenden Chlorophylls erklären läßt (vgl. hierzu die früheren Arbeiten des Verfassers).

Als Gegenargumente stehen folgende Punkte zur Erwägung:

1. Die Kohlensäureassimilation ist ein Reduktionsvorgang, der erheblichen Energieaufwand beansprucht, während es sich in den vorliegenden Modellversuchen um die Oxydation eines leicht dehydrierbaren Körpers handelt.

Hierzu ist zu sagen: Eisensalze können sowohl reduzierend als oxydierend wirken, derart, daß nach den Vorstellungen von *Haber*[1]) ein feuchter Oxydationsprozeß einen reversiblen Vorgang darstellt. Bei den besonderen energetischen Verhältnissen in den Chloroplasten wäre eine Verschiebung des Gleichgewichts nach der Seite der Reduktion an sich jedenfalls denkbar. Ferner findet *Hr. Wieland*[2]) auch bei der Sauerstoffaktivierung durch Schwermetall, durch Kupfer, zunächst Wasserstoff, der sich bei Vorhandensein von Luftsauerstoff an diesen unter Peroxydbildung anlagert. Falls ähnliches für die hier in Frage kommenden Vorgänge angenommen werden darf, so würde dies besagen, daß auf Grund einer durch das belichtete Chlorophyll bedingten Eisenanregung Wasserstoff aktiviert wird, der nur beim Fehlen des normalen Akzeptors der biologischen Reaktion, der Kohlensäure, mit molekularem Sauerstoff zu einem Peroxyd zusammentritt, das die oben erwähnten Zellschädigungen hervorruft. Einen Anhaltspunkt für das Auftreten von aktivem Wasserstoff im Verlauf der normalen Kohlensäureassimilation erblickt der Verfasser in der von ihm gefundenen Tatsache[3]), daß Assimilationshemmung durch Kohlensäureentzug, Überfütterung mit Zucker oder Narkotisierung bei währender Belichtung in flavonolhaltigen Blättern Hydrierung des Flavonols zu Anthocyan in den grünen Zellen zur Folge hat.

Diese Vermutung über eine Mitwirkung des Eisens bei der Kohlensäureassimilation schließt nicht aus, daß dieses auch an der Aktivierung der Kohlensäure beteiligt sein könnte.

2. Die beschleunigende Wirkung des Eisens auf die Photooxydation des Benzidins durch Eosin ist keine echte Katalyse, sondern eine induzierte Reaktion.

Auch hiergegen kann unter Zurückgreifen auf die besondere Leistungsfähigkeit der grünen Zelle die Annahme gemacht werden, daß durch irgendwelche Prozesse eine Regeneration des verbrauchten Eisens stattfindet. Davon abgesehen bestehen zwischen induzierender und katalytischer Wirkung keine scharfen Grenzen.

Betreffs der Hemmung der Eisenwirkung bei der Benzidinphotooxydation durch saures Sulfit sei noch folgendes mitgeteilt:

Der Verfasser hatte (l. c., 1925) gezeigt, daß die Rauchgasschädigung (Schwefelsäurevergiftung der Vegetation) in Assimilationssistierung und der dadurch ermöglichten photodynamischen Wirkung des Chloro-

---

[1]) *F. Haber*, Zeitschr. f. physikal. Chem. **34**, 513, 1900; zusammen mit *F. Bran*, ebendaselbst **35**, 81, 1900; *F. Haber*, Zeitschr. f. Elektrochem. **7**, 441, 1900/01.

[2]) *Hr. Wieland*, Ann. d. Chem. **434**, 185, 1923.

[3]) *Kurt Noack*, Zeitschr f. Botanik **14**, 1, 1922.



phylls auf das Protoplasma zu suchen ist. Die Modellversuche der vorliegenden Arbeit lassen den Schluß zu, daß diese Assimilationshemmung auf Eisenabbindung zurückzuführen ist. Hieraus ergibt sich die Folgerung, daß mit schwefliger Säure im Dunkeln vorbehandelte Pflanzen durch Darreichung von Eisenverbindungen vor der erst im Lichte einsetzenden Nachwirkung der Behandlung mit schwefliger Säure mehr oder weniger geschützt werden könnten. Noch nicht abgeschlossene Untersuchungen im Institut des Verfassers lassen diese Annahme als berechtigt erscheinen und ergeben umgekehrt eine Bestätigung der in dieser Arbeit vorgetragenen Ansichten.

Der Verfasser ist sich bewußt, daß Modellversuchen wie den vorliegenden für die Erklärung biologischer Vorgänge nur bedingter Wert zukommt und daß eine Behandlung des Problems der Kohlensäureassimilation nicht an einzelne Eigentümlichkeiten des komplizierten Aufbaus der Chloroplasten und eine einzige Eigenschaft des Chlorophylls gebunden bleiben darf. Jedoch hält er sich für berechtigt, einen Lebensvorgang, der noch so gut wie vollständig im Dunkeln liegt, auch von einem einseitigen Standpunkt aus zu beleuchten.

Die vorliegende Untersuchung wurde mit Unterstützung der Notgemeinschaft der Deutschen Wissenschaft ausgeführt, wofür dieser auch hier der Dank ausgesprochen sei.

Zusammenfassung.

Der Verfasser untersuchte im Hinblick auf die Kohlensäureassimilation der grünen Pflanze und auf die Tatsache des Eisenvorkommens in den Chloroplasten die photooxydative Wirkung des Eosins und fluoreszierenden Chlorophylls auf Benzidin, ein System, das er schon früher behandelt hat, und versuchte durch Zusatz von Eisen, eine Beschleunigung der Benzidinphotooxydation zu erzielen, wie er sie früher durch Manganzusatz erhalten hatte.

Es zeigte sich, daß besonders Ferrosalze eine beträchtliche Beschleunigung der Benzidinphotooxydation durch Eosin wie auch durch fluoreszierendes Chlorophyll bewirken, jedoch mit dem Unterschied gegenüber Mangansalzen, daß nur sehr geringe Eisenmengen wirksam sind und größere, die noch unter der wirksamen Minimalkonzentration des Mangans liegen, völlige Hemmung der Reaktion zur Folge haben.

Das Eisen wirkt hierbei induzierend, während Kupfer, als Sulfat verwandt, noch weit stärker wirksam ist und die Reaktion katalytisch beeinflußt.

Die hemmende Wirkung von schwefliger Säure und Cyankali in kleinen Mengen auf die Kohlensäureassimilation findet in den Modellversuchen eine Analogie, indem diese Stoffe die beschleunigende

Wirkung des Eisens im belichteten System Eosin—Benzidin aufheben, so daß auch auf Grund dieser Versuche eine Beteiligung des Eisens an der Kohlensäureassimilation denkbar ist.

Die Untersuchung macht es ferner wahrscheinlich, daß die Fluoreszenzeigenschaft des Chlorophylls mit einer aktivierenden Wirkung des belichteten Farbstoffs auf Eisen irgendwie verbunden ist, das dann seinerseits in einer ebenfalls noch unklaren Weise bei der Kohlensäureassimilation beteiligt zu denken ist.

Die vom Verfasser früher gefundene Tatsache, wonach die Rauchgasschädigung der Vegetation in einer Hemmung der Photosynthese und der damit verbundenen Ablenkung der photochemischen Energie des Chlorophylls auf das Protoplasma besteht, läßt sich an Hand der obigen Modellversuche dahin erweitern, daß der eigentliche Angriffspunkt der schwefligen Säure im Eisen des Assimilationsapparats zu suchen ist.

Über die enzymatische Milchsäurebildung im Muskelextrakt.

III. Mitteilung:

Die Milchsäurebildung aus den gärfähigen Hexosen.

Von

Otto Meyerhof.

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für Biologie, Berlin-Dahlem.)

(Eingegangen am 13. Januar 1927.)

Mit 20 Abbildungen im Text.

Inhalt.

Wie in den vorangehenden Mitteilungen[1]) gezeigt, werden die verschiedenen Kohlehydrate in abstufbarer Leichtigkeit durch das gelöste milchsäurebildende Enzym des Muskels gespalten. Am leichtesten, wenn auch keineswegs mit größter Geschwindigkeit, die Hexosediphosphorsäure der Gärung, da cofermentfreier Muskelextrakt,

[1]) Diese Zeitschr. 178, 395, 462, 1926.

ferner solcher, der durch Erwärmen auf 37° oder 24stündiges Stehen auf Eis seine sonstige glykolytische Fähigkeit eingebüßt hat, noch zur Spaltung des Phosphorsäureesters in äquimolekulare Mengen Milchsäure und Phosphorsäure imstande ist. Dann folgen die Polysaccharide und ihre anhydrischen Spaltprodukte, Glykogen, Stärke, Amylopectin, Amylose, Trihexosan und Dihexosan, die von frischem Muskelextrakt, der mit isotonischer KCl-Lösung oder destilliertem Wasser hergestellt ist, mit nahezu gleicher und für mehrere Stunden nur langsam abfallender Geschwindigkeit in Milchsäure gespalten werden, einer Geschwindigkeit, die bei genügendem Phosphatgehalt etwa der spontanen Milchsäurebildung zerschnittener Muskulatur gleichkommt. Als dritte Gruppe folgen die gärfähigen Hexosen, deren Spaltung zwar in bestimmt hergestelltem, frischem Extrakt und daraus gewonnenen Trockenpräparaten schon an und für sich stattfinden kann, aber viel rascher erlischt als der Umsatz der Polysaccharide. Jedoch kann durch Zusatz eines aus der Hefe gewonnenen Aktivators dem unwirksamen Muskelextrakt die Fähigkeit zu äußerst rascher Glykolyse verliehen werden. Mit diesem Gegenstand beschäftigt sich die vorliegende Mitteilung, wobei die weitgehende Analogie des Hexoseumsatzes im „aktivierten“ Muskelextrakt und bei der zellfreien alkoholischen Gärung in einem besonderen Kapitel behandelt wird.

I. Milchsäurebildung aus Hexosen ohne Hefeaktivator.

Mit unterkühlter isotonischer Kaliumchloridlösung hergestellte Extrakte aus Froschmuskeln (Temporaria) sind den Hexosen gegenüber nahezu wirkungslos, erheblich aktiver dagegen die mit destilliertem Wasser hergestellten Auszüge. Allerdings sind diese, speziell aus der Muskulatur von Herbstfröschen, nicht so frei von Kohlehydrat wie die Kaliumchloridextrakte. Doch läßt sich bei Zusatz von Hexosen eine deutliche, oft mehrere Stunden anhaltende Steigerung der schwachen spontanen Milchsäurebildung erzielen. Dabei ergibt sich zum Unterschied vom Umsatz der Polysaccharide, daß diese Spaltung niemals mit hoher Geschwindigkeit einsetzt, um dann auf ein nahezu konstantes Niveau abzufallen, sondern daß umgekehrt die Spaltung oft erst nach einer längeren Induktionsperiode beginnt und dann entweder konstant ist oder schwach ansteigt.

Noch günstigere Resultate als mit den Wasserextrakten aus Temporarienmuskeln erzielt man mit Extrakten aus Kaninchenmuskulatur, besonders wenn auch hier die Extraktion mit Wasser oder hypotonischer KCl-Lösung geschieht. Da hier häufig der Glykogenumsatz rasch abfällt, während der Zuckerumsatz langsam steigt, kann sogar in gewissen Perioden der letztere größer sein. Im ganzen werden aber auch hier die gärfähigen Hexosen mit kaum der halben Geschwindig-

keit wie das Glykogen umgesetzt. Während ferner ein 15 Stunden auf Eis gehaltener Extrakt aus Kaninchenmuskeln die Polysaccharide noch gut spaltet, ist seine Fähigkeit gegenüber den Hexosen erloschen. Die Abstufung der Empfindlichkeit ist hier also dieselbe wie im Froschmuskelextrakt, aber das ganze Fermentsystem stabiler. Schließlich kann man durch Fällung von frischem Extrakt, der Hexosen glykolysiert, ein haltbares Acetonpulver gewinnen, das auch noch zur Spaltung der Zucker befähigt ist.

Die Versuche wurden zum großen Teil nach der manometrischen Methode unter Berücksichtigung der hierbei anzubringenden Korrekturen für Milchsäureretention und Phosphatumsatz (Veresterung bzw. Abspaltung) und eventuell noch für Verdünnung bei Zusatz des Kohlehydrats ausgeführt. Wie schon in der ersten Arbeit erwähnt, liefert beim Umsatz der Hexosen ohne Aktivator die manometrische Methode etwas zu kleine Werte, denn bei der Spaltung der Hexosen wird der präformierte Phosphorsäureester (Lactacidogen) meist mehr oder weniger stark aufgespalten. Die hierbei auftretende Alkalisierung ist aber größer als sich aus der Differenz der $p_{K_2'}$-Werte von Phosphorsäure und Hexosediphosphorsäure berechnet[1]). Inzwischen wurden auch die Dissoziationskonstanten der Hexosemonophosphorsäuren (*Robison*sche und *Neuberg*sche Säure) bestimmt[2]). $p_{K_2'}$ für diese ergab sich, wie erwartet, kleiner als bei der *Harden-Young*schen Säure, nämlich zu 6,11. Schreibt man dem *Embden*schen „Lactacidogen" hypothetisch eine solche Konstitution zu[3]), so wird die Übereinstimmung zwischen beobachteter und berechneter p_H-Verschiebung besser. Bei totaler Abspaltung des Phosphats aus dem Ester muß dann in der Gegend des Neutralpunkts die p_H-Verschiebung 0,70 betragen, was unter den Bedingungen der manometrischen Versuche gleich 112 cmm CO_2 für 1 mg P_2O_5 ist, während sich für die Spaltung der Hexosediphosphorsäure pro 1 mg P_2O_5 82 cmm CO_2 ergibt. Während vorläufig der größere Wert, der allerdings immer noch etwas zu klein erscheint, für die Aufspaltung des präformierten Esters verwandt wird, werden als Veresterungskorrektur für Bildung und Spaltung des Di-Esters wie bisher 82 cmm CO_2 und bei Zusatz von Salzen in m/10 Konzentration 100 cmm CO_2 (p_H-Verschiebung 0,61) benutzt.

Der Verlauf des Phosphatumsatzes beweist, daß den Hexosen eine verhältnismäßig geringe Veresterungstendenz zukommt. Im Gegensatz zum Umsatz der Polysaccharide nimmt bei der Glucosespaltung das veresterte Phosphat meist nicht zu, sondern ab. Man könnte deshalb

---

[1]) Vgl. *O. Meyerhof* und *J. Suranyi*, diese Zeitschr. **178**, **440**, 1926.

[2]) Vorläufige Mitteilung *O. Meyerhof* und *K. Lohmann*, Naturw. **14**, 1277, 1926.

[3]) Vgl. *Embden* und *Zimmermann*, Ber. d. ges. Physiologie **88**, **157**, 1926.

die Frage aufwerfen, ob der Zerfall der Hexosen überhaupt über einen Phosphorsäureester führt. Das ergibt sich aber, abgesehen von den Versuchen des nächsten Abschnitts, aus dem Verhalten des Fluorids. In mittleren Konzentrationen kommt es hier bei gleichzeitiger Hemmung der Glykolyse zu einer Anhäufung der Hexosediphosphorsäure. Im Sinne der in der vorigen Arbeit gegebenen Erklärung der Fluoridwirkung[1]) häuft sich das Stabilisierungsprodukt der Veresterung an, da die Wiederaufspaltung des Esters gehemmt wird. Bei sehr hoher Fluoridkonzentration nimmt der Phosphorsäureester nicht zu, weil hier außer der Spaltung auch die Synthese gehemmt wird. Daß die Veresterung der Glucose unter der Wirkung des Fluorids von anderen Forschern bisher nicht beobachtet wurde, ist verständlich, da eben eine solche Veresterung nur unter Bedingungen stattfindet, die bei Abwesenheit von Fluorid die Milchsäurebildung ermöglichen. Diese liegen aber bei den Hexosen nur unter speziellen Umständen vor.

Im folgenden sind einige Versuche mit Wasserextrakt von Froschmuskulatur sowie Wasser- und Kaliumchloridextrakt von Kaninchenmuskulatur wiedergegeben. Aus den Kurven ersieht man das allmähliche Ansteigen der Glykolyse in den ersten Versuchsstunden. Wird das Kohlehydrat vorher zugesetzt, so entgeht besonders bei Kaninchenmuskelextrakt ein erheblicher Teil des Glykogenumsatzes der Messung, während der Glucoseumsatz nahezu vollständig in die Meßperiode fällt. Dadurch scheinen die betreffenden Versuche (Tabelle III) etwas zu günstig. Auch sind in den Tabellen nur die positiven Versuche aufgeführt, während ein nicht unbeträchtlicher Teil mit den Hexosen ohne Aktivatorzusatz überhaupt negativ verläuft.

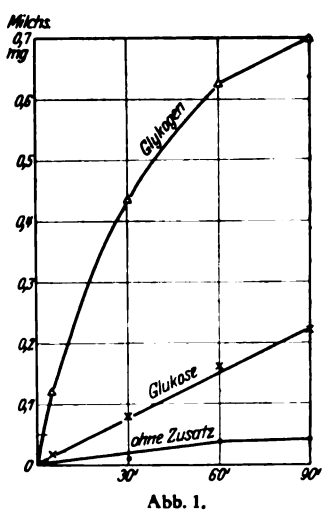


Abb. 1.
Spaltung von Glykogen und Glucose durch Wasserextrakt aus Froschmuskeln ohne Aktivator.
●——● ohne Zusatz.
×——× mit Glucose.
△——△ mit Glykogen.

A. Froschmuskelextrakt.

Als Beleg für einen durchschnittlichen Versuch von Wasserextrakt aus Froschmuskulatur diene Abb. 1. Als weiteres Beispiel ist in der Tabelle I ein Versuch (9. Juni 1926) angegeben, in dem neben der Milchsäurebildung die Phosphatveresterung bestimmt ist. Während mit Glucose allein eine teilweise Aufspaltung

[1]) Diese Zeitschr. 178, 482, 1926.

des präformierten Esters erfolgt, nimmt in Gegenwart von Glucose + Fluorid die Veresterung zu.

Tabelle I.

9. Juni 1926. Je 0,5 ccm dest. Wasserextrakts aus Froschmuskeln auf 0,9 ccm aufgefüllt; mit 0,02 mol. $NaHCO_3$ und den angegebenen Kohlehydratzusätzen, in 90 Minuten bei 20°.

Nr.	Kohlehydrat	Sonstiger Zusatz	mg Milchsäure (korrigiert für Veresterung)	P_2O_5 Änderung	Daraus Veresterung in mg Zucker	Totaler Zuckerumsatz in mg
1	—	—	0,085	—	—	—
2	0,22 Proz. Glucose	—	0,406	+ 0,030	(— 0,04)	0,41
3	0,22 Proz. Glucose	0,02 n NaF	0	— 0,257	0,33	0,33
4	0,45 Proz. Stärke	—	0,734	— 0,140	0,18	0,91

Der Vergleich der Glykolysegeschwindigkeit verschiedener Zucker ist in der Tabelle II enthalten, wo in der letzten Spalte die relative Umsatzgeschwindigkeit (für Stärke = 100) unter Abrechnung der spontanen Milchsäurebildung verzeichnet ist (vgl. auch Tabelle III, Nr. 2, mit Kaninchenmuskulatur).

Tabelle II.

Umsatzgeschwindigkeit verschiedener Hexosen ohne Aktivator.
Je 0,6 ccm Wasserextrakt auf 0,9 ccm geben in 90 Minuten bei 20°:

Nr.	Datum	Kohlehydratzusatz	mg Milchsäure	Proz. des Stärkeumsatzes
1a	10. VI.	—	0,052	—
b		0,4 Proz. Glykogen	0,54	63
c		0,4 „ Stärke	0,83	100
d		0,2 „ Glucose	0,20	20
e		0,2 „ Fructose	0,18	17
f		0,2 „ Mannose	0,15	13
g		0,2 „ Galaktose	0,07	3
2a	11. VI.	—	0,088	—
b		0,4 „ Stärke	0,56	100
c		0,2 „ Glucose	0,29	42
d		0,2 „ Maltose	0,15	13
e		0,2 „ Amylobiose	0,16	16
f		0,2 „ Saccharose	0,088	0

Während Galaktose und Saccharose unwirksam sind, werden die anderen Mono- und Disaccharide, wenn auch mit geringerer Geschwindigkeit als Glucose gespalten. Das Verhältnis zwischen Glucose und Fructose wechselt jedoch, indem in etwas älterem Extrakt die Fructosespaltung sich als stabiler erweist.

B. Kaninchenmuskelextrakt.

Die größere Stabilität des Kaninchenmuskelextrakts, die bereits in der ersten Arbeit dieser Serie hervorgehoben ist, bewährt sich auch in der Milchsäurebildung aus Hexosen, wobei die relative Wirkungsstärke im Vergleich mit Glykogen bei 20⁰ und 37⁰ ziemlich ähnlich ist. In Tabelle III ist eine Versuchsserie angegeben, wo bei 37⁰ mit demselben Extrakt der Hexosenumsatz sofort, nach 3½ und nach 21 Stunden untersucht ist. Hierbei sind auch einige Versuche mit Insulin aufgeführt, die zeigen, daß es auf die Geschwindigkeit der Spaltung keinen Einfluß hat. Auch wenn in gealtertem Extrakt die Glucose spontan nicht mehr angegriffen wird, wird durch Insulin niemals eine Aktivierung erreicht oder eine Veresterung der Glucose mit Phosphat ermöglicht. Auch in Verbindung mit Hefeaktivator besitzt das Insulin keine erkennbare Wirkung auf den Umsatz der Glucose im Muskelextrakt von Frosch- oder Kaninchenmuskulatur.

Tabelle III.

1. Juni 1926. Je 0,52 ccm Extrakt in 0,9proz. KCl auf 1,0 ccm aufgefüllt. Umsatz bei 37⁰ in 90 Minuten.

Nr.	Extrakt	Kohlehydratzusatz	Insulin in g	mg Milchsäure	Proz. des Glykogenumsatzes
1a	frisch	—	—	0,10	—
b	"	4 mg Glykogen	—	1,33	100
c	"	2 " Glucose	—	1,27	95
d	"	2 " "	$4 \cdot 10^{-5}$	1,24	95
e	"	2 " "	$2 \cdot 10^{-6}$	1,26	95
2a	$3^1/_2{}^h$ später	—	—	0,02	—
b	"	4 mg Glykogen	—	0,99	100
c	"	2 " Glucose	—	0,86	85
d	"	2 " "	$4 \cdot 10^{-5}$	0,75	75
e	"	2 " Fructose	—	0,44	43
f	"	2 " Mannose	—	0,48	47
g	"	2 " Galaktose	—	0,035	2
h	"	2 " Maltose	—	0,14	12
3a	21^h später	—	—	0,07	—
b	"	4 mg Glykogen	—	0,44	100
c	"	2 " Glucose	—	0,07	0

Während die glykolytische Wirksamkeit des Extrakts bei 3½stündigem Stehen in Eis noch nicht bedeutend geschwächt ist, ist sie nach 21stündigem Stehen gegenüber Glucose erloschen, gegenüber Glykogen auf ein Drittel gefallen.

Bei Extrakten, die Glucose gut spalten, gelingt es, dies Vermögen durch Herstellung von Acetondauerpräparaten für Wochen zu konservieren. Tabelle IV enthält eine derartige Versuchsreihe, in der die

Tabelle IV.

83 g Muskulatur. in der Fleischmaschine zerkleinert + 120 ccm Wasser. Vom zentrifugierten Extrakt 40 ccm in 400 ccm eiskalten Acetons gegossen, nach Waschen mit Äther und Trocknen im Vakuum erhalten 1,08 g Acetonpulver. Versuchstemperatur 38°. Je 1 ccm Flüssigkeit mit 0,03 mol. $NaHCO_3$ und den angegebenen Zusätzen.

Nr.	Datum	Präparat	Extraktmenge ccm	Versuchszeit Min.	Kohlehydrat	Sonstiger Zusatz	Milchsäure mg	P_2O_5		Zuckerveresterung mg	Zuckergesamtumsatz
								Gehalt	Änderung		
1a	17. VI.	Frischer Extrakt	0,58	60	—	—	0,11	1,085	—	—	—
b		„ „	0,58	60	4 mg Glykogen	—	1,24	1,03	— 0,05	0,07	1,31
c		„ „	0,58	60	2 „ Glucose	—	1,15	0,91	— 0,175	0,22	1,37
d		„ „	0,58	60	2 „ „	Hefeaktivator	1,005	0,44	— 0,73	0,94	1,94
2a	17. VI.	4h alt	0,58	60	—	—	0,06	0,92	—	—	—
b		4h „	0,58	60	3 mg Glucose	—	0,04	—	—	—	—
c		4h „	0,58	60	3 „ Fructose	—	0,48	—	—	—	—
d		4h „	0,58	60	3 „ Glucose	Hefeaktivator	1,15	0,63	— 0,29	0,37	1,52
e		4h „	0,58	60	3 „ Fructose	„	1,15	—	—	—	—
3a	18. VI.	Frisches Acetonpulver	27 mg = 1 ccm Saft	90	—	—	0,03	—	—	—	—
b		Dasselbe	Dasselbe	90	4 mg Glykogen	—	0,60	—	—	—	—
c		„	„	90	2 „ Glucose	—	0,245	—	—	—	—
d		„	„	90	2 „ Fructose	—	0,33	—	—	—	—
e		„	„	90	2 „ Glucose	Hefeaktivator	0,78	—	—	—	—
4a	6. VII.	Altes Acetonpulver	27 mg = 1 ccm Saft	90	—	—	0,03	—	—	—	—
b		Dasselbe	Dasselbe	90	4 mg Glykogen	—	0,88	—	—	—	—
c		„	„	90	2 „ Glucose	—	0,53	—	—	—	—
d		„	„	90	2 „ „	Hefeaktivator	1,66	—	—	—	—

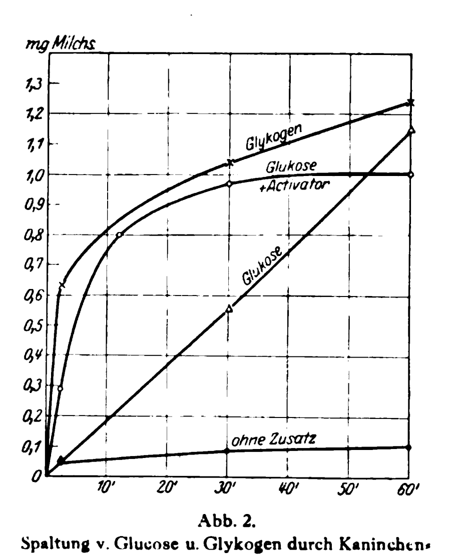


Abb. 2.
Spaltung v. Glucose u. Glykogen durch Kaninchenmuskelextrakt bei 37°. Tabelle IV, Versuch 1:

●———● ohne Zusatz.
△———△ mit Glucose.
⊙———⊙ mit Glucose + Aktivator.
×———× mit Glykogen.

Im Versuch Glucose + Aktivator ist wegen der gleichzeitigen Veresterung bereits nach 30′ der ganze vorhandene Zucker (2 mg) umgesetzt, wodurch der rasche Abfall der Geschwindigkeit verursacht ist.

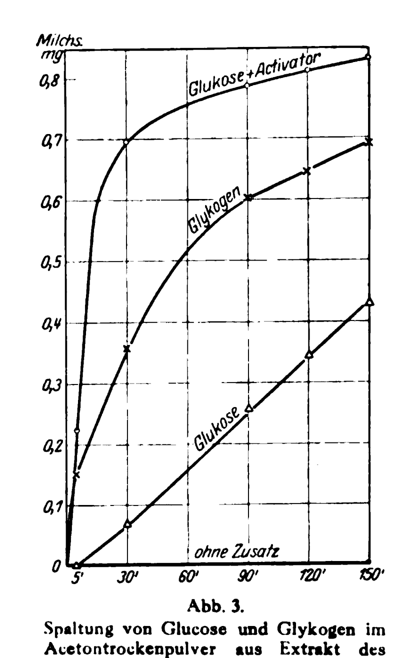
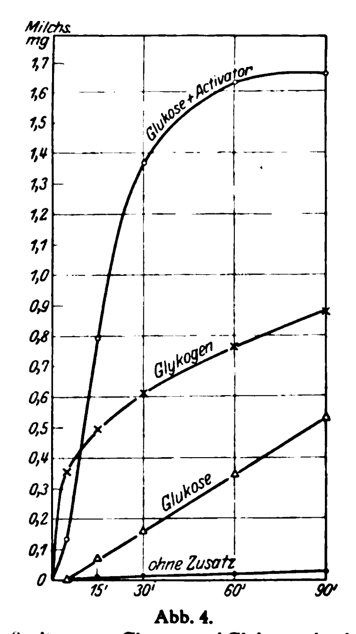


Abb. 3.
Spaltung von Glucose und Glykogen im Acetontrockenpulver aus Extrakt des Versuchs Abb. 2.

●———● ohne Zusatz.
△———△ mit Glucose.
⊙———⊙ mit Glucose + Aktivator.
×———× mit Glykogen.



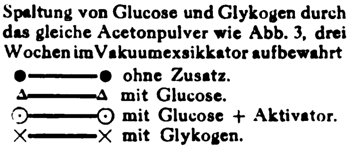


Abb. 4.
Spaltung von Glucose und Glykogen durch das gleiche Acetonpulver wie Abb. 3, drei Wochen im Vakuumexsikkator aufbewahrt

●———● ohne Zusatz.
△———△ mit Glucose.
⊙———⊙ mit Glucose + Aktivator.
×———× mit Glykogen.

Wirksamkeiten des frischen Extrakts, des Extrakts nach mehreren Stunden, sowie der Acetondauerpräparate nach 1 Tag und 3 Wochen untersucht sind.

Die Versuche 1, 3 und 4 der Tabelle IV sind auch auf den Abb. 2, 3 und 4 für die ganze Versuchszeit dargestellt. Sowohl in der Tabelle wie auf den Abbildungen sind einige Versuche unter Zusatz von Hefeaktivator enthalten, die in das nächste Kapitel gehören. Der außerordentliche Unterschied in der Geschwindigkeit der Anfangsperiode ist sehr auffallend. Der rasche Abfall in Gegenwart des Aktivators steht mit der Erschöpfung des Phosphats bzw. des freien Zuckers in Zusammenhang, worauf unten eingegangen wird. In dem Versuch 1 ist auch die Phosphatveresterung angegeben. Aus 1d, letzte Spalte sieht man, daß der Gesamtzuckerumsatz der zugegebenen Glucosemenge fast genau entspricht.

II. Milchsäurebildung aus Hexosen mit Hefeaktivator.

A. Übersicht.

Die besondere Eigentümlichkeit der Hexosespaltung im Muskelextrakt besteht, abgesehen von ihrer größeren Empfindlichkeit, in dem langsamen Einsetzen der Reaktion. Wie bei den Polysacchariden die schnelle Anfangsperiode mit der starken Anhäufung von Phosphorsäureester zusammenfällt, ist umgekehrt bei dem Glucoseumsatz die Veresterungstendenz klein. Es lag nahe, diese Veresterungstendenz durch Zugabe eines Hefeauszugs zu verstärken, da ja der Zucker im Hefeextrakt während der ersten Gärungsperiode glatt verestert wird. Dieser Gedanke erwies sich als richtig, und der verantwortliche Aktivator war leicht zu isolieren. Seine Lösung blieb, im Eisschrank aufbewahrt, für Wochen haltbar. Bei Zugabe einer gewissen Menge Aktivator, die bei der gewöhnlichen Herstellung ohne weitgehende Reinigung gegen 1 mg organische Trockensubstanz enthält auf 1 ccm Glykolysegemisch, wird der Verlauf der Zuckerspaltung vollständig verändert. Sie setzt nunmehr mit sehr hoher, für eine gewisse Zeit ziemlich konstanter Geschwindigkeit ein, die dann steil abfällt und einer zweiten Periode stark herabgesetzter, aber für längere Zeit ebenfalls annähernd konstanter Geschwindigkeit Platz macht. Die gleichzeitige Untersuchung der Phosphatveresterung lehrt, daß in der ersten Periode Phosphat verestert wird, und zwar äquimolekular zu der entstehenden Milchsäure, daß aber der rasche Abfall in den Zeitmoment fällt, wo entweder der freie Zucker durch Übergang in Milchsäure und Ester, oder aber das freie Phosphat durch Veresterung völlig verschwunden ist und nunmehr die Wiederaufspaltung der gebildeten Hexosediphosphorsäure die Geschwindigkeit der Gesamtreaktion bestimmt. Allerdings kommt es in

weniger guten Extrakten oder auch bei geschwächtem Aktivator öfters zu einem Stillstand des Prozesses, ehe das anorganische Phosphat oder der freie Zucker erschöpft ist. Häufiger noch als dieses vorzeitige Stehenbleiben ereignet sich eine andere Abweichung von der obigen Regel: Bei Überschuß an Zucker sinkt nach totaler Veresterung des anorganischen Phosphats die Geschwindigkeit nicht auf einen konstanten Wert, der etwa der Spaltungsgeschwindigkeit zugesetzter Hexosediphosphorsäure entspricht, sondern sinkt annähernd oder ganz auf Null. Versuche mit variierter Zuckermenge und solche, die in einer späteren Arbeit über die Spaltung der Hexosemonophosphorsäuren mitgeteilt werden, zeigen, daß bei gänzlichem Fehlen des anorganischen Phosphats der Fermentkomplex geschwächt ist und unter solchen Umständen auch die Wiederaufspaltung angehäufter Hexosediphosphorsäure nicht mehr glatt gelingt. Man erkennt dies leicht, indem dann bei kleinerer Zuckerkonzentration, die nicht hinreicht, das Phosphat restlos zu verestern, die Wiederaufspaltung rascher verläuft und der Gesamtumsatz den bei größerer Zuckermenge schließlich übertrifft. Vorweggenommen sei zu dem im folgenden Kapitel angestellten Vergleich mit der alkoholischen Gärung, daß diese sich bei völligem Fehlen des anorganischen Phosphats ähnlich verhält. Wie schon *Harden* und *Young* beobachteten[1]), kommt sie ebenfalls unter solchen Umständen zum Stehen, und Zugabe von Phosphat wirkt nunmehr auf den Gesamtumsatz viel stärker, als der Äquivalentbeziehung der *Harden-Young*schen Gleichung entspricht.

Bei der Analyse der Vorgänge sehen wir von diesen unvollständigen Spaltungen ab und beschäftigen uns nur mit den normal verlaufenden, bei denen in geeigneter Konzentration der zugesetzte Zucker in kurzer Zeit total umgesetzt wird. Da der Prozeß stets in zwei scharf getrennte Perioden zerfällt, analog der alkoholischen Gärung im Hefeextrakt, so gibt der Gesamtumsatz in der Versuchszeit nicht eine bestimmte Geschwindigkeit wieder. Die Geschwindigkeit der Veresterungs- oder Phosphatperiode muß von der Geschwindigkeit der zweiten Phase, die durch die Wiederaufspaltung der Hexosediphosphorsäure bestimmt wird, unterschieden werden, und nur die Kurve des Verlaufs gibt ein richtiges Bild. Da anfangs ebensoviel Zucker durch Veresterung wie durch Milchsäurebildung verschwindet, muß zur vollständigen Analyse der Phosphatumsatz gleichzeitig bestimmt werden. In den Kurven ist der Phosphatschwund, umgerechnet auf Milligramm äquimolekulare Milchsäure, nach unten von der Abszisse aufgetragen. Die ,,Veresterungskorrektur" der manometrischen Messungen ist hier ziemlich beträchtlich. Einige chemische Bestimmungen dienten teils zur Kontrolle der mano-

---

[1]) Proc. Roy. Soc., Ser. B, 82, 321, 1910.

metrischen Messungen, teils (vgl. Tabelle VIII) zur Ermittlung des Anfangsverlaufs nach Zusatz des Zuckers.

Das System Muskelenzym + Hefeaktivator ist zur Spaltung der Glucose auch in solchen Säften imstande, die sonst keine Spur einer Glucosespaltung zeigen, wie vor allem im Kaliumchloridextrakt aus Froschmuskulatur. Andererseits ist es doch nicht so stabil wie das System der Glykogenspaltung. Es versagt leicht in mehreren Stunden alten Froschmuskelextrakten, wobei außer der Beschaffenheit des Extrakts auch das Alter des Hefeaktivators eine Rolle spielt. Während dann unter Umständen überhaupt keine Reaktion mehr eintritt, kann man bei guter Beschaffenheit von Enzym und Aktivator durch Abstufung der Menge des letzteren eine abgestufte Geschwindigkeit der Phosphatperiode erreichen und hieran die wirksame Aktivatormenge abschätzen. In den folgenden Abschnitten ist zunächst die Herstellung und die Haltbarkeit des Aktivators behandelt und anschließend die Kinetik des Zuckerzerfalls.

B. Herstellung des Aktivators.

Bäckerhefe, z. B. 250 g, wird zunächst, etwa der *Willstätter*schen Vorschrift zur Darstellung des Invertins folgend, mit wenig Toluol verrieben und 3/4 Stunden bei 35° plasmolysiert, dann mit dem gleichen Gewicht Wasser verrührt, 2 bis 3 Stunden in den Brutschrank von 35° gestellt. Die Hefe wird scharf abzentrifugiert, der Auszug verworfen und der Heferückstand wiederum mit dem gleichen Gewicht Toluolwasser verrührt und über Nacht bei 35° stehengelassen. Am nächsten Morgen wird auf einer rasch laufenden Zentrifuge (5000 Touren in der Minute) zentrifugiert, die überstehende, stark gelbliche, aber durchsichtige Lösung auf 0° abgekühlt und mit dem gleichen Volumen Alkohol bei 0° gefällt. Auf diese Weise wird die ganze im Hefeautolysat enthaltene Aktivatormenge niedergeschlagen. Der Niederschlag wird mit Wasser verrieben und wieder scharf zentrifugiert. Es bleibt ein erheblicher unlöslicher Rückstand, der unwirksam ist und verworfen wird, während die Lösung den Aktivator enthält (A).

Einige Versuche von Herrn Dr. *Lohmann*, die das Verhalten des Aktivators bei den Fällungen betrafen, bewiesen die Richtigkeit dieser Prozeduren, indem a) die 50proz. alkoholische Lösung nach Entfernung des Niederschlags praktisch frei von Aktivator ist, b) die Fällung mit höherer Alkoholkonzentration eine zusätzliche Fällung hervorruft, die nur unwirksamen Ballast darstellt, c) durch Verreiben mit Wasser die ganze Aktivatormenge in Lösung geht und der Rückstand unwirksam ist.

Zur weiteren Reinigung kann der Hauptteil der Aktivatorlösung nochmals auf 0° abgekühlt werden und wiederum mit dem gleichen Volumen eiskalten Alkohols gefällt werden. Es fällt nunmehr ein feiner

Niederschlag, der die Hauptmenge des Aktivators enthält. Die Fällung wird abzentrifugiert, mit einem kleinen Volumen Wassers verrieben, die Lösung durch Zentrifugieren geklärt. Diese Aktivatorlösung B enthält häufig den Aktivator in noch reinerer Form; wie es scheint, insbesondere dann, wenn der Niederschlag in Alkohol nur kurze Zeit stehen bleibt. In anderen Fällen aber treten hierbei erhebliche Verluste ein. Bei richtiger Herstellung kann die Lösung B fast phosphatfrei sein, während die Aktivatorlösung A noch ziemlich viel Phosphat enthält. Ein großer Teil der Versuche wurde mit der Lösung B angestellt; wo sich diese aber als weniger wirksam erwies, wurde die Lösung A benutzt.

C. Eigenschaften des Aktivators.

Die bisherigen mehr orientierenden Versuche über die Eigenschaften des Aktivators betreffen

1. das Trockengewicht der gerade noch wirksamen Menge,
2. die Temperaturempfindlichkeit und Haltbarkeit in wässeriger Lösung.

1. Trockengewicht der wirksamen Menge.

Die Beispiele für Punkt 1, das Trockengewicht der wirksamen Aktivatormenge, beziehen sich alle auf die Aktivatorlösungen A. Die B-Lösungen wurden in dieser Richtung noch nicht genauer untersucht. Bei dem Vergleich darf nur die Umsatzgeschwindigkeit in dem ersten Teile der Phosphatperiode berücksichtigt werden, und zwar bei gut wirksamen Extrakten. Einige Beispiele sind in der Tab. V zusammengestellt. Versuch 1 betrifft eine Aktivatorlösung, die aus Verarbeitung von 250 g Hefe gewonnen ist und gut 100 ccm betrug. Sie enthielt pro Kubikzentimeter 21,7 mg Trockensubstanz mit 2,3 mg Asche. Der ganze Verlauf der Spaltungen ist auf Abb. 5 dargestellt. In der Tabelle sind für den Wirksamkeitsvergleich nur die ersten 15 Minuten benutzt. Versuch 2: 10 ccm Aktivatorlösung aus 20 g Hefe enthalten pro Kubikzentimeter 10,9 mg Trockensubstanz (Asche nicht bestimmt). Versuch 3: 18 ccm Autolysat aus 8,5 g Hefe wurden zunächst mit Essigsäure

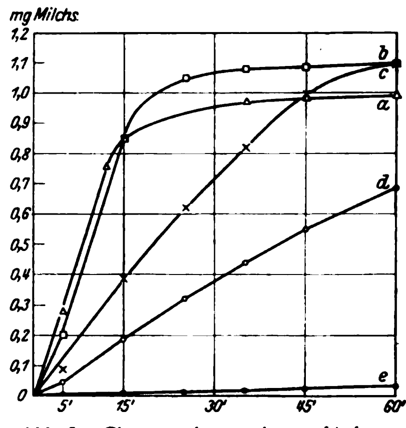


Abb. 5. Glucosespaltung mit verschiedenen Aktivatormengen. Froschmuskelextrakt.
Δ——Δ Kurve a: Aktivator B von hoher Konzentration aber kleinerem Phosphatgehalt.
□——□ Kurve b: 2,9 mg v. Aktivator A.
×——× Kurve c: 0,97 mg v. Aktivator A.
⊙——⊙ Kurve d: 0,39 mg v. Aktivator A.
●——● Kurve e: ohne Zusatz.

angesäuert, der Niederschlag abfiltriert, dann neutralisiert und jetzt mit dem gleichen Volumen Alkohol gefällt. 10 ccm Lösung (nach Entfernung des Rückstandes) enthalten pro Kubikzentimeter 8,3 mg Trockensubstanz mit 1,9 mg Asche. Aus den Versuchen sieht man, daß der Aktivator bis herab auf 0,4 mg pro 1 bis 1,5 ccm Glykolysegemisch die Zuckerspaltung in Gang setzt, daß aber die Geschwindigkeit mit wachsender Aktivatormenge noch erheblich steigt.

Tabelle V.

Umsatz bei wechselnden Aktivatormengen.

Nr.	Datum	Extraktmenge	Flüssigkeitsmenge	Glucose mg	Zeit Min.	Aktivator: Organische Trockensubstanz pro 1 ccm Aktivatorlösung mg	Aktivator: Benutzte Aktivatorlösung ccm	Aktivator im Versuch mg	Milchsäure mg	Relative Anfangsgeschwindigkeit
1a	25. XI.	0,5	1,0	3	15	?	0,15	Überschuß	0,84	100
b		0,5	1,0	3	15	19,4	0,15	2,9	0,80	96
c		0,5	1,0	3	15	19,4	0,05	0,97	0,30	36
d		0,5	1,0	3	15	1,94	0,2 (verd. 1 : 10)	0,39	0,14	17
2a	27. VII.	0,7	1,5	3	20	10,0	0,35	3,5	0,89	100
b		0,7	1,5	3	20	10,0	0,20	2,0	0,76	85
c		0,7	1,5	3	20	10,0	0,10	1,0	0,60	67
3a	28. VII.	0,7	1,5	3	20	6,6	0,24	1,6	1,39	100
b		0,7	1,5	3	20	6,6	0,12	0,80	0,83	60
c		0,7	1,5	3	20	6,6	0,06	0,40	0,44	32
d		0,7	1,5	3	20	—	0	—	0,09	—

2. Stabilität des Aktivators.

Der Aktivator ist sehr temperaturempfindlich und unterscheidet sich dadurch ebenso wie durch seine Alkoholfällbarkeit von dem Glucokinin *Collips*[1]) und anderen insulinähnlichen Substanzen. Durch kurzes Erwärmen im siedenden Wasserbad wird seine Wirksamkeit vernichtet, ja schon durch 5 Minuten langes Erwärmen auf 50° fast aufgehoben, und schon durch 1 Minute langes Erwärmen auf 50° stark geschwächt, ohne daß hierbei eine sichtbare Trübung auftritt. Ein solcher Versuch mit erwärmtem Aktivator ist auf Abb. 6 dargestellt. Auch gegen stärker saure und alkalische Reaktion ist der Aktivator sehr empfindlich. Versetzt man z. B. Proben mit so viel HCl oder NaOH, daß die Konzentration bezüglich Säure oder Base n/3 wird, läßt einige Minuten stehen und neutralisiert genau, so ist die Aktivität verschwunden. Dagegen ist der Aktivator, im Eisschrank aufbewahrt, in neutraler

[1]) *J. B. Collip*, Journ. of biol. Chem. **56**, 513; **57**, 65; **58**, 163, **1923**.

Lösung fast unbegrenzt haltbar. Doch scheint nach einigen Wochen seine Stabilität geringer zu werden. Wird er in diesem Zustande einige Zeit in verdünnter Bicarbonatlösung gehalten ohne gleichzeitige Kohlensäuredurchleitung, so entfesselt er nicht mehr den Zuckerumsatz, während er, wenn man Kohlensäure durch die Bicarbonatlösung hindurchleitet, wirksam bleibt. Hierbei macht man die eigentümliche Beobachtung, daß, wenn einmal der Glucoseumsatz mit einer gewissen, wechselnden Geschwindigkeit begonnen hat, diese während der ganzen Phosphatperiode konstant bleibt.

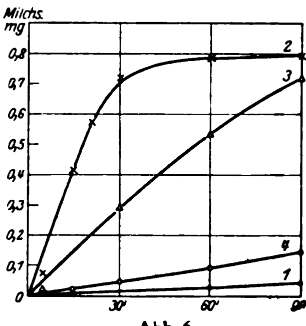


Abb. 6.
Temperaturempfindlichkeit des Aktivators (Versuch 10, 12, 26).
●——● 1: ohne Zusatz.
×——× 2: Glucoseumsatz mit 0,1 ccm Aktivator A (2 mg Trockensubstanz).
△——△ 3: derselbe, vorher 1 Minute auf 50° erwärmt.
⊙——⊙ 4: derselbe, vorher 5 Minuten auf 50° erwärmt.

Wenn auch die Natur und Wirkungsweise des Aktivators näher zu untersuchen ist, so ist nach dem Bisherigen sein Verhalten ähnlich dem eines Ferments, das den Zucker in Veresterungsform umlagert. Doch erleidet der Zucker hierbei ohne gleichzeitige Anwesenheit von Muskelenzym keine Änderung der Drehung oder Reduktionskraft. Gänzlich verschieden ist dieser Hefeaktivator einmal von Insulin und andererseits von der Cozymase, indem sich keiner dieser Stoffe gegenseitig vertreten kann. Insbesondere wird die Cozymase in gleicher Weise für die Spaltung des Glykogens wie der Glucose benötigt.

D. Verlauf des Glucoseumsatzes.

Der Verlauf der Milchsäurebildung aus Traubenzucker ist in einer Reihe von Kurven wiedergegeben, wobei in mehreren Fällen auch der Phosphatumsatz mit verzeichnet ist. Milchsäure und Phosphat sind stets auf die gleiche Molekülzahl umgerechnet. 1 mg Zucker = 1 mg Milchsäure = $1{,}11 \cdot 10^{-5}$ Mol. = 1,09 mg Phosphorsäure. Daß auch in diesen Fällen die manometrische und chemische Methode der Milchsäurebestimmung gut übereinstimmende Werte liefern, ist schon in der ersten Abhandlung[1]) gezeigt.

In den manometrischen Versuchen kann der Phosphatgehalt nur am Anfang und Ende bestimmt werden, wodurch nur ein Punkt auf der Veresterungskurve gefunden wird. Es wurde deshalb in mehreren Versuchsserien eine größere Zahl Parallelbestimmungen angesetzt, die nach verschiedenen Zeiten abgebrochen wurden. Diese sind den Abb. 7 bis 10 zugrunde gelegt.

[1]) Diese Zeitschr. 178, 404, 1926, Tabelle I.

Tabelle VI[1]).

29. Juni 1926. Je 0,5 ccm Extrakt auf 1 ccm Flüssigkeit.

Nr.	Zucker je 2 mg	P_2O_5 am Anfang	P_2O_5 entspricht mg Zucker	Zeit in Min.	Milchsäure mg	Phosphatveresterung in mg Zucker	Summe Veresterung + Spaltung mg
1	Glucose	0,736	0,942	5	0,195	0,19	0,38
2	"	0,736	0,942	15	0,557	0,27	0,83
3	"	0,736	0,942	30	1,05	**0,905**	**1,96**
4	"	0,736	0,942	45	1,24	0,734	**1,98**
5	"	0,736	0,942	60	1,33	0,740	**2,09**
6	"	0,736	0,942	90	1,50	0,49	**1,99**
7	"	0,356	0,546	15	0,55	**0,484**	0,93
8	"	0,356	0,546	45	0,785	**0,504**	1,29
9	Fructose	0,736	0,942	90	1,37	0,38	**1,75**

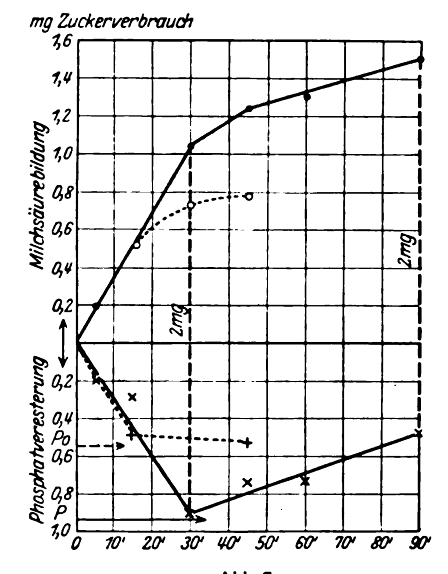


Abb. 7.
Umsatz von 2 mg Glucose durch Muskelextrakt mit Hefe-Aktivator.

●——●: Milchsäurebildung } mit vermehrter
×——×: Phosphatveresterung im Extrakt } Phosphatmenge.

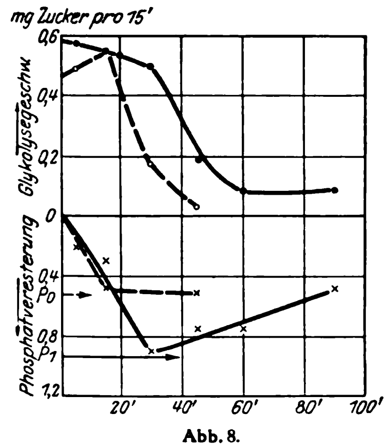
(Gehalt: 0,736 mg P_2O_5 äquivalent 0,942 mg Zucker. Die vertikalen gestrichelten Linien entsprechen dem Umsatz der im ganzen vorhandenen 2 mg Glucose.)

○·······○: Milchsäurebildung. } ohne Phosphatzusatz.
×·······×: Phosphatveresterung }

(Präformierter Gehalt P_2O_5: 0,356 mg, entsprechend 0,546 mg Zucker.)

P mit ausgezogenem Strich → Phosphatgehalt des 1. Versuchs, P_0 → gestrichelt, Phosphatgehalt des 2. Versuchs. Die einzelnen Kurvenpunkte entsprechen Nr. 1 bis 8 der Tabelle VI.

[1]) Die fettgedruckten Zahlen dieser und der folgenden Tabellen entsprechen dem Totalumsatz von Phosphat bzw. Zucker.



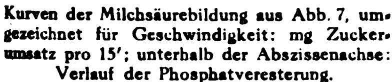


Abb. 8.

Kurven der Milchsäurebildung aus Abb. 7, umgezeichnet für Geschwindigkeit: mg Zuckerumsatz pro 15'; unterhalb der Abszissenachse: Verlauf der Phosphatveresterung.

Ausgezogene Kurven: mit Phosphatzusatz.

Gestrichelte Kurven: ohne Phosphatzusatz.

Die anfangs etwa gleiche Umsatzgeschwindigkeit fällt bei kleinerem Phosphatgehalt eher ab als bei höherem, in beiden Fällen im Augenblick der totalen Veresterung.

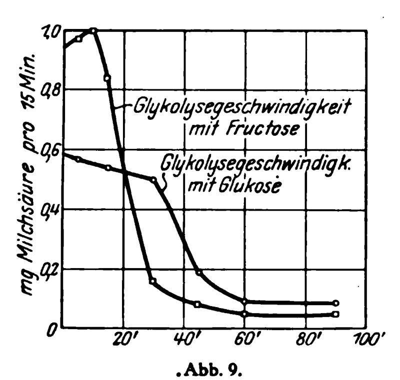


Abb. 9.

Geschwindigkeit der Glucose- und Fructosespaltung mit gleicher Aktivatormenge und gleichem Phosphatgehalt. Mit Fructose ist die Geschwindigkeit während der Phosphatperiode fast doppelt so hoch, fällt aber entsprechend der schnelleren Veresterung um so eher ab. Die von den beiden Kurven umschlossenen Flächen oberhalb des horizontal laufenden Endstücks sind etwa gleich und repräsentieren den Zuckerumsatz, der dem veresterten Phosphat entspricht.

Ein anderer Reihenversuch mit Fructose, aber weniger vollständiger Bestimmung des Phosphatverlaufs, ist in Tabelle VII und auf der Abb. 10 dargestellt.

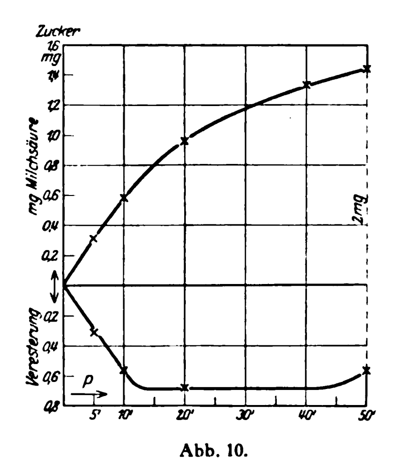


Abb. 10.

Umsatz von 2 mg Fructose durch aktivierten Muskelextrakt. Phosphatgehalt: 0,574 mg P_2O_5 entsprechend 0,735 mg Zucker. Kurz vor 50' beginnt die Wiederaufspaltung des Esters wegen des Verbrauchs des überschüssigen Zuckers. Die gestrichelte vertikale Linie entspricht 2 mg Zucker, d. h. der zum Versuch zugesetzten Menge.

Tabelle VII.

2. Juli 1926. Umsatz von 2 mg Fructose mit zur Veresterung nicht ausreichender Phosphatmenge. P_2O_5-Gehalt am Anfang 0,574 mg entspricht 0,735 mg Zucker.

Nr.	Zeit in Min.	Milchsäure mg	Phosphatveresterung in mg Zucker	Summe Veresterung + Spaltung mg
1	5'	0,313	0,309	0,62
2	10	0,59	0,545	1,04
3	20	0,96	0,700	1,66
4	50	1,44	0,583	2,02

Um auch in den ersten Minuten, wo die manometrische Bestimmung wegen des nicht momentanen Durckausgleichs ungenaue Resultate liefert, das Verhältnis von Milchsäure und Phosphatveresterung zu kennen, wurde eine Reihe chemischer Bestimmungen gemacht, indem nach 2, 5, 10 (und 15) Minuten aliquote Teile abpipettiert wurden. Die Versuche sind in der folgenden Übersicht angegeben und Nr. 2 und 3 der Tabelle VIII mit fast demselben Phosphatgehalt auf Abb. 11 dargestellt, die gestrichelten Kurven mit Fructose, die ausgezogenen

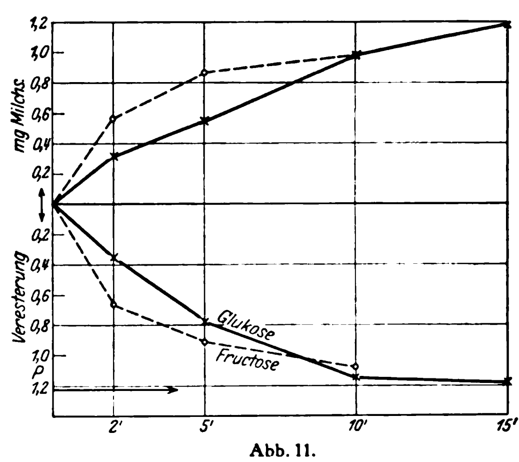


Abb. 11.

Spaltung und Veresterung von Glucose und Fructose in den ersten Minuten nach Zugabe zum Extrakt (Milchsäure chemisch bestimmt). Die Veresterung verläuft fast genau symmetrisch zur Milchsäurebildung. Ausgezogene Linie: Glucose, gestrichelte: Fructoce.

mit Glucose. Der symmetrische Verlauf von Veresterung und Milchsäurebildung ist hier deutlich zu sehen, indem im Fructoseversuch beides anfangs rascher geht, aber dann schneller abfällt.

Tabelle VIII.

Zuckerumsatz in den ersten Minuten nach Zusatz.

Nr.	Datum	Zucker je 3 mg	Phosphatgehalt am Anfang in mg P_2O_5	Phosphatgehalt am Anfang entspricht mg Zucker	Zeit	Milchsäure gebildet mg	Phosphat verestert (in mg Zucker)	Summe Veresterung + Spaltung mg
1a	14.VII.	Glucose	1,013	1,30	2′	0,20	0,37	0,57
b		"	1,013	1,30	5	0,43	0,63	1,06
c		"	1,013	1,30	10	0,955	**1,26**	2,22
2a	14.VII.	Fructose	0,961	1,23	2	0,56	0,66	1,12
b		"	0,961	1,23	5	0,87	0,904	1,77
c		"	0,961	1,23	10	0,99	1,07	2,06
3a	22.VII.	Glucose	0,963	1,23	2	0,26	0,34	0,60
b		"	0,963	1,23	5	0,56	0,78	1,34
c		"	0,963	1,23	10	0,99	1,14	2,13
d		"	0,963	1,23	15	1,18	**1,20**	2,38

Aus den angegebenen Versuchen lassen sich die folgenden Schlüsse ziehen:

Bei der Spaltung von Glucose und Fructose wird zunächst gleichzeitig mit dem Entstehen der Milchsäure eine äquimolekulare Menge Phosphat verestert. Wenn auch ganz am Anfang die Proportion nicht immer streng erfüllt ist, ist sie in dem Zeitpunkt, wo bei Überschuß von Zucker das anorganische Phosphat verschwunden ist, fast stets genau 1 : 1. In diesem Augenblick fällt die vorher hohe und annähernd konstante Spaltungsgeschwindigkeit rasch ab und kommt auf einen niedrigen, für längere Zeit ziemlich konstanten Wert. Dies letztere ist besser in den länger fortgesetzten folgenden Versuchen zu sehen. Solange noch veresterungsfähiger Zucker vorhanden ist, bleibt der Phosphatgehalt fast Null, nimmt aber nach Veresterung des Zuckers wieder zu, so daß der gesamte Zuckerumsatz (Spaltung + Veresterung) eine gewisse Zeit konstant bleibt und gleich dem zugesetzten Zucker ist (s. Abb. 7 und 10). Wenn die Phosphatmenge wieder zunimmt, so ist, wie besonders in Abb. 7 zu sehen ist, die Milchsäurezunahme genau parallel der Phosphatabspaltung: für 1 Mol. freigesetzter Phosphorsäure entsteht 1 Mol. Milchsäure, die Milchsäure stammt jetzt also aus Hexosediphosphorsäure. Weiter zeigt der Vergleich von Fructose und Glucose im selben Versuch, daß die erstere in der Phosphatperiode nahezu doppelt so rasch reagiert und infolgedessen bei gleichem Phosphatgehalt die Geschwindigkeit früher abfällt. Manchmal sinkt allerdings der Fructoseumsatz schon innerhalb der Phosphatperiode, was als Fermentschädigung aufgefaßt werden muß.

Wenn bei Überschuß an Zucker der Umsatz in der raschen Periode durch die vorhandene Phosphatmenge bestimmt wird, derart, daß

pro 1 Mol. veresterter Phosphorsäure 1 Mol. Milchsäure auftritt, so muß der Umsatz in dieser Periode offenbar dem am Anfang vorhandenen anorganischen Phosphat genau proportional sein. Daß dies zutrifft, geht aus den folgenden Beispielen hervor: In Abb. 12 (3. Juli 1926)

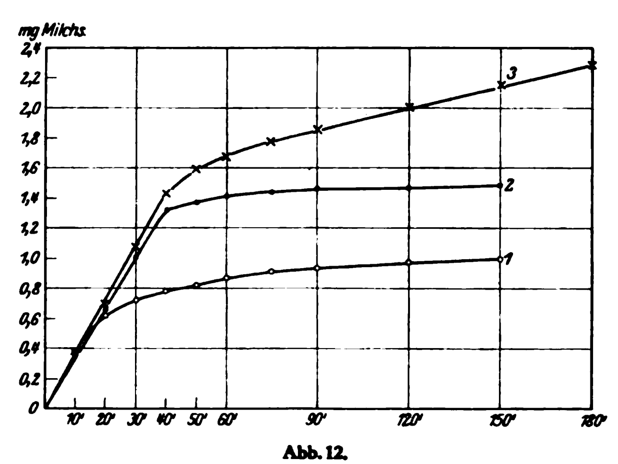


Abb. 12.

Milchsäurebildung aus 3 mg Glucose in 1 ccm Lösung bei wechselnden Mengen Phosphat.
Kurve 1: 0,43 mg P_2O_5, entsprechend 0,55 mg Milchsäure.
" 2: 0,80 " " " 1,03 " "
" 3: 1,18 " " " 1,51 " "

Die in allen drei Fällen gleich hohe Anfangsgeschwindigkeit sinkt auf ein konstantes Niveau ab, sobald etwa die dem vorhandenen Phosphat äquimolekulare Milchsäuremenge gebildet ist. Die Endgeschwindigkeit in Versuch 3 ist aber höher als in Versuch 1 und 2, weil hier der Zucker durch Spaltung und Veresterung verbraucht ist und infolgedessen der Phosphatgehalt wieder ansteigt.

ist derselbe Extrakt und die gleiche Glucosemenge (je 3 mg pro 1 ccm) mit drei verschiedenen Mengen Phosphat benutzt. Die Geschwindigkeit während der Phosphatperiode ist in allen drei Fällen gleich, sinkt aber jäh ab in dem Moment, wo eine dem vorhandenen Phosphat etwa äquivalente Menge Milchsäure gebildet ist. Kurve 1 entspricht einem P_2O_5-Gehalt von 0,43 mg, äquimolekular 0,55 mg Milchsäure, Kurve 2: 0,78 mg P_2O_5, äquimolekular 1,0 mg Milchsäure; Kurve 3: 1,18 mg P_2O_5, äquimolekular 1,51 mg Milchsäure. Die Endgeschwindigkeit ist in diesem dritten Falle jedoch höher als in den beiden anderen. Hier ist nämlich nach der Rechnung der zugesetzte Zucker schon in 50 Minuten teils gespalten und teils verestert, und daher steigt die Phosphatmenge nachher entsprechend der Spaltung der Hexosediphosphorsäure wieder an. In den Kurven 1 und 2 bleibt sie dagegen wegen des Überschusses an Zucker zunächst nahezu Null. Dies führt, wie oben besprochen, zu der zunehmenden Verlangsamung des Umsatzes in der zweiten Periode. Späterhin kann Hexosediphosphat aufgespalten werden, ohne daß, trotz Anwesenheit von Zucker, eine neue Veresterung stattfindet. Es

liegt dies an der Labilität des aktivierten Fermentsystems, das bei 20° nur etwa 2 Stunden funktionstüchtig bleibt.

Daß man die Geschwindigkeit, wenn sie durch Veresterung des Phosphats abgesunken ist, durch neuen Zusatz von Phosphat wieder erhöhen kann, bis auch das jetzt zugesetzte verestert ist, ist auf den

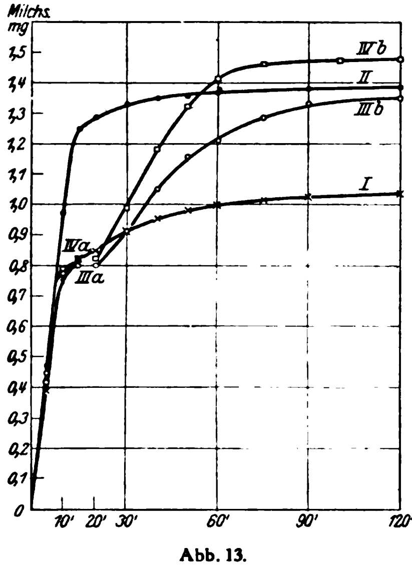


Abb. 13.

Verlauf der Milchsäurebildung aus Glucose bei zweimaligem Zusatz von Phosphat (Versuch 9. VII. 1926). Zuckergehalt 2,8 mg in 0,85 ccm.

I: Glykolyseverlauf bei 0,688 mg P_2O_5, entsprechend 0,88 mg Milchsäure.

II: Verlauf bei 0,99 mg P_2O_5, entsprechend 1,27 mg Milchsäure.

IIIa und IVa: Verlauf während 15' bei 0,688 mg P_2O_5 wie in I. Dann in IIIa: Phosphat (0,35 mg P_2O_5) entsprechend 0,45 mg Milchsäure zugegeben: Kurve IIIb. In IVa 0,43 mg P_2O_5 entsprechend 0,55 mg Milchsäure u. neuer Aktivator zugesetzt: Kurve IVb. In IIIb und IVb steigt die Geschwindigkeit von neuem, bis eine Milchsäuremenge produziert ist, die etwa äquimolekular dem neu zugesetzten Phosphat ist. In III und IV Umsatz zwischen 15' u. 20' nicht bestimmt.

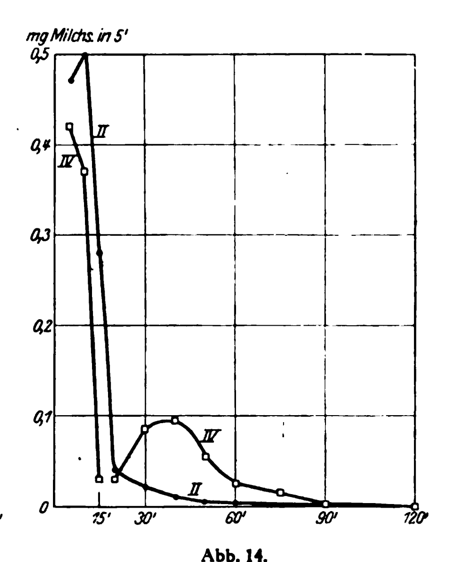


Abb. 14.

Geschwindigkeit der Milchsäurebildung (mg pro 5') in den Kurven II und IV der Abb. 13.

●——● Geschwindigkeit bei Gegenwart von 0,99 mg P_2O_5, entsprechend 1,27 mg Milchsäure.

⊡——⊡ 1. Kurvenstück: Geschwindigkeit bei Gegenwart von 0,688 mg P_2O_5, entsprechend 0,88 mg Milchsäure.

2. Stück: nach neuem Zusatz von Aktivator und Phosphat, entsprechend 0,55 mg Milchsäure.

Die geringere Steigerung beim zweiten Phosphatzusatz rührt, abgesehen von der stärkeren Verdünnung des Extrakts von seiner rasch nachlassenden enzymatischen Wirksamkeit her

Abb. 13 und 14 dargestellt. Die dazu gehörigen Versuche nebst einigen weiteren sind in der folgenden Tabelle IX angeführt. Man sieht aus der letzten Spalte der Tabelle und ebenso aus der Abb. 13, daß nach dem zweiten Zusatz des Phosphats der Umsatz so lange erhöht bleibt, bis die theoretisch erwartete Milchsäuremenge entstanden ist. Gleichwohl besteht zwischen der ersten und zweiten Phosphatperiode ein großer Unterschied der Geschwindigkeit (s. Abb. 14). Die starke Ver-

ringerung in der zweiten Periode ist teils auf die Verdünnung des Extrakts durch die Zusätze, in höherem Maße aber wohl auf die fortschreitende Schädigung des Fermentkomplexes zu beziehen. Da es möglich war, daß auch der Aktivator unwirksam geworden war, wurde in Versuch 5 (Abb. 13, Kurve 4b) außer Phosphat noch neuer Aktivator hinzugegeben. Dadurch wird indessen die Geschwindigkeit nur wenig höher als ohne diesen Zusatz, so daß wahrscheinlich das Ferment selbst an Wirksamkeit nachgelassen hat.

Tabelle IX.

Versuch: 9. Juli 1926. Je 2,8 mg Glucose mit 0,45 ccm Extrakt.

Nr.	Periode	Flüssigkeitsmenge ccm	P_2O_5 zu Beginn der Periode (+ = Phosphatzusatz)	P_2O_5 entspricht mg Zucker	Dauer des Umsatzes	Milchsäure gebildet total mg	Milchsäure gebildet in Hauptperiode mg	Milchsäure erwartet in Hauptperiode mg	Phosphatveresterung am Schluß mg	Gesamtumsatz: Spaltung + Veresterung mg
1	I	0,85	0,69	0,885	120′	1,03	**0,85**	**0,89**	0,602	**1,63**
2	I	0,85	0,99	1,265	120	1,38	**1,28**	**1,26**	1,05	**2,31**
3	I	0,85	0,69	0,885	10	0,76	**1,40**	**1,34**	1,05	**2,39**
	II	0,92	+ 0,35	0,45	105	0,70				
4	I	0,85	0,69	0,885	15	0,80	**1,35**	**1,34**	0,99	**2,33**
	II	0,92	+ 0,35	0,45	100	0,55				
5	I	0,85	0,69	0,885	15	0,83	**1,47**	**1,44**	1,05	**2,49**
	II	1,00	+ 0,43	0,55	100	0,64				

Die Deutung des eigentümlichen Zusammenhangs zwischen Phosphatveresterung und Milchsäurebildung kann keine andere sein, als daß sich das Phosphat mit Zucker zu einer labilen Hexosephosphorsäure verestert, die im status nascens zur Hälfte zerfällt und zur anderen sich als Hexosediphosphorsäure stabilisiert. Im Moment, wo entweder das anorganische Phosphat oder der freie Zucker verschwunden ist, wird nunmehr die Geschwindigkeit durch die Aufspaltung der Hexosediphosphorsäure bestimmt, die in äquimolekulare Mengen Milchsäure und Phosphorsäure zerfällt. Dieser letztere Zerfall geschieht, wie schon in der vorigen Arbeit gezeigt wurde, ohne Mitwirkung des Coferments. Die Ursache der hälftigen Teilung der Zuckermoleküle, die eng mit der Frage nach der Konstitution des labilen Esters zusammenhängt, wird in der folgenden Arbeit untersucht werden[1]).

Zum Schluß sei erwähnt, daß die Spaltung des Glykogens und der Stärke durch den Hefeaktivator nur wenig, im höchsten Falle bis zu 50 Proz. gesteigert wird. Dieser geringe Einfluß kann zwanglos auf

---

[1]) Vgl. auch *O. Meyerhof* und *K. Lohmann*, Vorläufige Mitteilung, Naturw. 14, 1277, 1926.

einen zusätzlichen Umsatz der hydrolytisch entstandenen Glucose bezogen werden, da nach *K. Lohmann* die Verzuckerung der Polysaccharide rascher verläuft als ihre Spaltung in Milchsäure.

E. Beeinflussungen des Zuckerumsatzes.

1. Arseniat.

Wie im folgenden Kapitel noch im einzelnen zu zeigen ist, stimmt die Glucosespaltung im Muskelextrakt erstaunlich genau überein mit der alkoholischen Gärung des Zuckers im Hefesaft, und es ist daher von Interesse festzustellen, ob diejenigen Stoffe, die die Gärgeschwindigkeit in spezifischer Weise beeinflussen, diese Wirkung hier auch ausüben. Das ist offenbar besonders für diejenigen Stoffe zu erwarten, die bei der Veresterung oder Wiederaufspaltung des Esters angreifen. Ein besonders gutes Beispiel bietet das Arseniat. Dieses erhöht die Gärgeschwindigkeit durch Steigerung der Hexosephosphatspaltung[1]). Daß bei geeigneter Anordnung eine Steigerung der Milchsäurebildung zu erwarten ist, ergibt sich aus den älteren Versuchen mit zerschnittener Muskulatur, wo die Geschwindigkeit der spontanen Milchsäurebildung durch etwa m/100 Natriumarseniat um 50 bis 100 Proz. erhöht wurde[2]). Allerdings fiel schon damals auf, daß der Zerfall zugesetzten Glykogens und zugesetzter Hexosediphosphorsäure nicht gesteigert wurde. Ebensowenig konnte durch m/100 bis m/1000 Arseniat eine Steigerung des Glykogenumsatzes im Muskelextrakt erzielt werden, vielmehr zeigten sich starke Hemmungen[3]). Dies liegt aber wesentlich an der großen Empfindlichkeit des Ferments in Lösung in Verbindung mit der spezifischen Natur der Arseniatwirkung. Durch erhöhte Aufspaltung der Hexosediphosphorsäure kann die Spaltung der Polysaccharide nur dann beschleunigt werden, wenn die Veresterung hiermit Schritt hält und wenn nicht, wie häufig, die Stabilität des Fermentsystems durch Verringerung der Hexosephosphatkonzentration leidet. Geht man mit der Arseniatkonzentration genügend herab, auf etwa m/1500 bis m/2000, so kann man die Stärke- und Glykogenspaltung in guten Extrakten deutlich steigern, wobei stets die Anhäufung der Hexosediphosphorsäure verringert ist oder sogar ganz wegfällt. Viel regelmäßiger wird aber in diesen Fällen die Spaltung zugesetzter Hexosediphosphorsäure erhöht, und zwar in den ersten Stunden um 50 bis 100 Proz. und hierbei eine der vermehrten Milchsäure genau entsprechende Menge anorganisches Phosphat mehr gebildet. Daß auch

---

[1]) *Harden* und *Young*, Proc. Roy. Soc., Ser. B., 83, 451, 1911; *O. Meyerhof*, Hoppe-Seylers Zeitschr. f. phys. Chem. 102, 185, 1918.
[2]) Pflügers Arch. 188, 114, 1921.
[3]) Diese Zeitschr. 178, 489, 1926.

unter diesen Umständen Phosphorsäure und Milchsäure genau äquivalent bleiben, beweist, daß das Arseniat nicht nur die Hydrolyse des Hexosephosphats steigert, sondern den tieferen Zerfallsprozeß (Abb. 15 und 16). Wie Abb. 16 zeigt, hört die starke Steigerung der Hexosephosphatspaltung bei höheren Arseniatkonzentrationen nach 20 bis 30 Minuten auf und macht einer Hemmung Platz, so daß der Gesamtumsatz bei verschiedenen Arseniatkonzentrationen nach etwa einer Stunde gleich ist. Doch ist diese Hemmung der Spaltung wohl in-

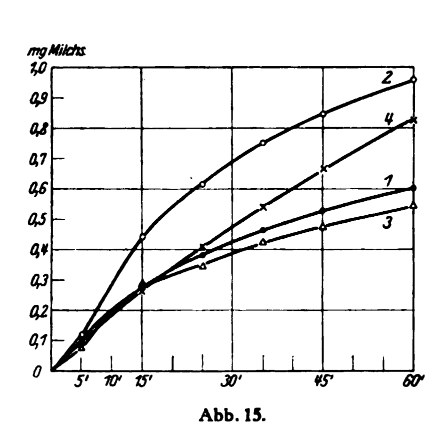


Abb. 15.

Milchsäurebildung aus Stärke und Hexosediphosphat unter Zusatz von Arseniat (Versuch Nr. 1 und 2, Tabelle X).
Arseniatkonzentration 6 . 10^{-4} mol.

1.: Hexosediphosphat ohne Zusatz.
2.: Hexosediphosphat mit Arseniat.
3.: Stärke ohne Zusatz.
4.: Stärke mit Arseniat.

Die Steigerung des Zerfalls des Hexosediphosphats unter der Wirkung von Arseniat beginnt sofort, dagegen die der Stärke erst später, entsprechend der allmählichen Anhäufung des Esters.

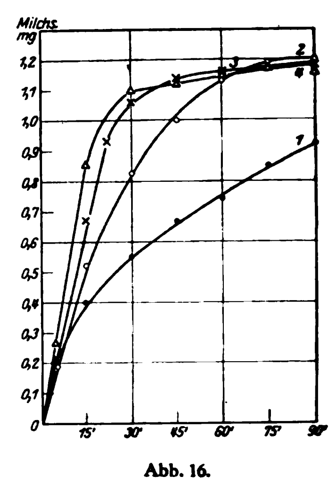


Abb. 16.

Milchsäurebildung aus Hexosediphosphat unter Einfluß von Arseniat.

1.: ●———● ohne Arseniat.
2.: ⊙———⊙ mit 6,3 . 10^{-4} mol. Arseniat.
3.: ×———× mit 1,26 . 10^{-3} mol. Arseniat.
4.: △———△ mit 6,3 . 10^{-3} mol. Arseniat.

Die nach 20 bis 30′ einsetzende Hemmung bei höheren Arseniatkonzentrationen ist wahrscheinlich indirekt durch die starke Anhäufung des anorganischen Phosphats bedingt.

direkter Natur und durch die zunehmende Anhäufung des anorganischen Phosphats bedingt. In der Tabelle ist deshalb nur die Zeit von 30 Minuten berücksichtigt. Schließlich wirkt das Arseniat in derselben Konzentration auch auf die Hexosenspaltung qualitativ gleich wie bei der Gärung, indem es die Phosphatperiode *verlängert,* durch rasche Wiederaufspaltung der stabilisierten Hexosediphosphorsäure. Qantitativ bleibt hier allerdings die Wirkung erheblich hinter der auf die Gärung zurück; doch entspricht auch hier die Mehrbildung an Milchsäure meist ziemlich

gut dem mehr abgespaltenen anorganischen Phosphat (s. Abb. 17 und Tabelle X, 7).

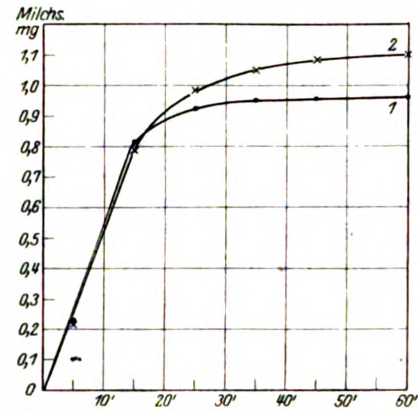


Abb. 17. Milchsäurebildung aus Fructose unter Zusatz von Arseniat.
1. Fructoseumsatz ohne Zusatz. 2. Fructoseumsatz mit 8,5 . 10^{-4} mol. Arseniat.
Die Geschwindigkeit ist nach Ablauf der Phosphatperiode etwas erhöht.

Eine Reihe von Versuchen mit verschiedenen Kohlehydraten ist in der folgenden Tabelle X wiedergegeben.

Tabelle X. Wirkung von Arseniat auf die Kohlehydratspaltung.

Nr.	Datum	Flüssigkeitsmenge ccm	Zeit	Kohlehydrat	Arseniatkonzentration 10^{-4} mol.	Umsatz in Milchsäure mg	Milchsäuremehrbildung mit Arseniat mg	P_2O_5 vorher	P_2O_5 nachher	Phosphatumsatz in mg Zucker	Phosphatmehrspaltung in mg Zucker mit Arseniat
1	16. XI.	1,0	60'	0,4 Proz. Stärke	—	0,60	—	—	—	—	—
a					6,3	0,825	**0,225**	—	—	—	—
2	19. XII.	1,1	60'	0,36 Proz. Stärke	—	0,31	—	0,596	0,438	− 0,204	—
a					6,3	0,42	**0,11**	—	0,520	− 0,097	**0,11**
3	16. XI.	1,0	60'	0,4 Proz. Mg-Hexose-phosphat	—	0,54	—	0,602	0,870	+ 0,343	—
a					6,3	0,96	**0,42**	—	1,22	+ 0,793	**0,45**
4	26. XI.	2,0	60'	0,01 mol. Na-Hexose-phosphat	—	0,83	—	1,645	2,14	+ 0,63	—
a					8,5	1,465	**0,635**	—	2,63	+ 1,26	**0,63**
5	17. XII.	1,0	30'	0,4 Proz. Mg-Hexose-phosphat	—	0,55	—	—	—	—	—
a					6,3	0,82	**0,27**	—	—	—	—
b					12,6	1,06	**0,51**	—	—	—	—
c					63	1,11	**0,56**	—	—	—	—
6	24. XI.	2,2	45'	0,3 Proz. Glucose	—	2,17	—	1,825	0,143	− 2,15	—
a					8,5	2,58	**0,41**	—	0,271	− 1,98	**0,17**
7	26. XI.	2,0	60'	0,3 Proz. Fructose	—	1,92	—	1,645	0,178	− 1,87	—
a					8,5	2,20	**0,28**	—	0,410	− 1,58	**0,29**

Das Verhalten des Arseniats ist auch im Hinblick auf die spontane Milchsäurebildung der zerschnittenen Muskulatur von Interesse, da von vornherein nicht zu entscheiden ist, welches eigentlich der die Geschwindigkeit kontrollierende Faktor innerhalb der Muskelstruktur ist. Dies scheint nun nicht die Veresterung, sondern die Aufspaltung des Esters zu sein, da man durch Erhöhung der Aufspaltung die spontane Milchsäurebildung steigern kann, und zwar ungefähr ebenso stark wie die Hexosephosphatspaltung im Saft. Für das Arseniat gibt es in der Tat keinen anderen Angriffspunkt, da die Annahme *Hardens*, daß auch die Glykogenhydrolyse dadurch erhöht würde, sich als irrtümlich erweist (s. unten, S. 206).

2. Andere Stoffe.

Im gleichen Zusammenhang wurde noch eine Reihe anderer Stoffe auf ihr Verhalten gegenüber der Milchsäurebildung im Muskelextrakt untersucht. Arsenit, das nach *Harden* ähnlich, aber schwächer und weniger regelmäßig die Gärung steigert als Arseniat, hat auf die Milchsäurebildung in kleinen Konzentrationen ($5 . 10^{-4}$ bis $1,5 . 10^{-3}$ mol.) keine Wirkung.

Ein besonderes Interesse beansprucht Coffein, da es die Milchsäurebildung intakter und zerschnittener Muskulatur stark steigert[1]). Es lag nahe, daß der Mechanismus hier ein anderer ist als bei Arseniat und mit der Veränderung der Muskelproteine zusammenhängt, die auch bei der Coffeinstarre in Erscheinung tritt. Diese Annahme wird weiter gestützt durch die Beobachtung von *Evans*[2]), daß die Milchsäurebildung glatter Muskulatur zwar durch Arseniat ebenso gesteigert wird, wie quergestreifter, aber nicht durch Coffein. In der Tat ist das Coffein in kleinen Konzentrationen (unter 0,005 Proz.) ohne Einfluß, während es in höheren zunehmend hemmt. Die Coffeinwirkung auf den lebenden Muskel beruht danach nicht auf einem direkten Eingriff in die Kohlehydratspaltung.

Während Aldehyde in Konzentrationen von $1 . 10^{-2}$ bis $2 . 10^{-3}$ n den Gäranstieg im Hefeextrakt und das Gärungsmaximum stark erhöhen, haben sie in diesem Konzentrationsbereich nur einen hemmenden Einfluß auf die Glykolyse. Dagegen tritt unter n/1000 eine Steigerung von 30 bis 50 Proz. in Erscheinung. Ob sie auf den gleichen Ursachen beruht wie die etwa zehnfach so große Steigerung der Gärgeschwindigkeit, ist fraglich, da die letztere offenbar mit der Akzeptorwirkung des Aldehyds für den überschüssigen Wasserstoff während der Bildung der Brenztraubensäure zusammenhängt[3]).

---

[1]) *O. Meyerhof*, Pflügers Arch. 188, 114, 1921.

[2]) Biochem. Journ. 20, 893, 1926.

[3]) *C. Neuberg*, diese Zeitschr. 88, 145, 1918; *Harden* und *Henley*, Biochem. Journ. 14, 642, 1920.

Während es bei dem Glucoseumsatz ohne Aktivator möglich ist, durch geeignete Fluoridkonzentrationen eine Trennung von Veresterung und Wiederaufspaltung herbeizuführen, ist dies in Gegenwart des Aktivators nicht mehr durchführbar. Der Veresterungsvorgang ist hier gegen Fluorid ebenso empfindlich wie die Spaltung, so daß gleichzeitig beide Prozesse gehemmt werden; auch dies ist, wie man im folgenden sieht, völlig analog mit dem Verhalten der alkoholischen Gärung, da auch dort nur bei Glykogen, aber nicht bei Glucose, durch Fluorid Veresterung und Spaltung getrennt werden können.

Weiterhin wurde im Vergleich zu der Hemmung der alkoholischen Gärung durch Blausäure und Schwefelwasserstoff der Einfluß dieser beiden Zellgifte, die Schwermetalle in komplexe Bindung überführen, auf die Milchsäurebildung im Muskelextrakt untersucht. Nach *O. Warburg* und *E. Negelein*[1]) ist zwar die alkoholische Gärung in lebender Hefe und im Hefemazerationssaft für beide Stoffe nur etwa $^1/_{500}$ so empfindlich als die Atmung; andererseits aber ist diese Wirkung für eine bloß narkotische erheblich zu hoch, und zwar hemmt $1 \,.\, 10^{-2}$ n Blausäure nach *Warburg* die Gärung im Mazerationssaft zwischen 50 und 90 Proz., $6 \,.\, 10^{-3}$ mol. H_2S nach *Negelein* die Gärung lebender Hefe um 80 Proz.

Die Milchsäurebildung im Muskelextrakt ist sowohl gegen Blausäure wie Schwefelwasserstoff noch unempfindlicher, auch unter Berücksichtigung der Konzentration der freien Säure, die bei p_H 7,5 im Muskelextrakt geringer ist als im Hefemazerationssaft (etwa p_H 6). Ist K die Dissoziationskonstante der betreffenden Säure, a die zugegebene Menge Alkalisalz derselben in molarer Konzentration, bezogen auf das benutzte Flüssigkeitsvolumen, $H^{\cdot}$ bzw. S' und (HS) die molaren Konzentrationen des freien H-Ions, des Säureanions und des ungespaltenen Moleküls, f der Faktor, der angibt, das Wievielfache von Säuremolekülen im ganzen, in Flüssigkeit und Gasraum vorhanden ist gegenüber dem Gehalt der Flüssigkeit, so gilt:

$$K = \frac{H^{\cdot} \,.\, S'}{(HS)}, \tag{1}$$

$$S' = a - f \,.\, (HS), \tag{2}$$

$$\frac{K}{H^{\cdot}} = \frac{a - f\,(HS)}{(HS)} \quad \text{oder} \quad (HS) = \frac{a}{\frac{K}{H^{\cdot}} + f}. \tag{3}$$

f setzen wir mit *E. Negelein*[2]) gleich

$$\frac{v_G \frac{273}{T} + v_F \,.\, \alpha}{v_F \alpha},$$

---

[1]) *O. Warburg*, diese Zeitschr. **165**, 196, 1925; *E. Negelein*, ebendaselbst **165**, 203, 1925.

[2]) a. a. O., S. 205.

wo v_G und v_F die Volumina des Gas- und Flüssigkeitsraums der Glykolysegefäße sind, T die absolute Temperatur und a der Absorptionskoeffizient der betreffenden Säure für die Versuchstemperatur 20°. $v_G \cdot \frac{273}{T}$ ist in meinen Versuchen durchschnittlich 4,8, $v_F = 1{,}0$.

Für Schwefelwasserstoff ist K_1 nach *Knox*[1]) $= 9{,}1 \,.\, 10^{-8}$; K_2, nach demselben Autor $= 1{,}2 \,.\, 10^{-15}$, kommt für unsere Verhältnisse nicht in Betracht; a nach *Winkler* bei $20^0 = 2{,}58$. Für $v_G = 4{,}8$ und $v_F = 1{,}0$ und $p_H = 7{,}5$ ergibt sich $\frac{K}{H} = 2{,}88$, $f = 2{,}84$. $(H_2S) = 0{,}175\,a$. Danach ist die zugesetzte Menge a mit 0,175 multipliziert.

Zur Erzeugung des H_2S diente NaHS, das unter Eiskühlung mit HCl vor der Zugabe zum Extrakt auf etwa 7,5 neutralisiert wurde. Die Hemmungsgröße erwies sich etwas von der Beschaffenheit der Muskelextrakte abhängig. In stark wirksamen Extrakten erhält man erst mit $3 \,.\, 10^{-2}$ mol. Hemmungen der Stärkespaltung von anfangs 50 Proz., die mit der Zeit nachlassen, während Konzentrationen von $1 \,.\, 10^{-2}$ mol. keine Wirkung haben, und etwas geringere die Geschwindigkeit leicht steigern. Die Spaltung der Hexosediphosphorsäure ist unter ähnlichen Umständen eher noch weniger empfindlich. In weniger guten Extrakten hemmt schon $2 \,.\, 10^{-2}$ H_2S um 90 Proz., $5 \,.\, 10^{-3}$ mol. zeigt eine eben merkliche Hemmung.

Noch etwas schwächer ist die Wirkung der Blausäure und ebenfalls von der Beschaffenheit des Extrakts abhängig. Auch hier kann man die Konzentrationen freier HCN nach der obigen Formel berechnen, doch weicht sie wenig von dem zugesetzten KCN ab. Die Dissoziationskonstante K ist $1{,}3 \,.\, 10^{-9}$; die Verteilung freier HCN zwischen Gasraum und Wasser fand ich in manometrischen Versuchen außerordentlich stark zugunsten der wässerigen Phase, a bei 20° erheblich über 200; f ist danach praktisch $= 1$ und $(HCN) = 0{,}96\,a$. $2 \,.\, 10^{-2}$ n HCN hemmt in guten Extrakten weder die Spaltung der Stärke noch des Hexosephosphats, dagegen werden beide durch $8 \,.\, 10^{-2}$ n um etwa 50 Proz. gehemmt. Etwas empfindlicher ist die Spaltung der Glucose, doch ist auch diese von $1 \,.\, 10^{-2}$ n HCN nicht mehr hemmbar. Wie die *Spaltung* der Stärke, wird auch die Veresterung gehemmt, es kommt also nicht wie bei Fluorid zu einer Anhäufung des intermediären Esters. Dies ergibt sich sowohl, wenn man direkt mit und ohne KCN die Summe von Milchsäurebildung und Veresterung bestimmt als auch, wenn man durch gleichzeitigen Zusatz von Fluorid die Anhäufung des Esters vermehrt (vgl. hierzu die folgende Übersicht).

[1]) Zeitschr. f. Elektrochem. 12, 479, 1906.

Tabelle XI.

Blausäurehemmung im Muskelextrakt. Je 1,0 ccm Flüssigkeit mit 0,5 ccm Extrakt und 0,4 Proz. Stärke.

Nr.	Datum	Zusätze		Zeit	Milchsäure	P_2O_5-Gehalt		Zucker verestert	Summe Veresterung + Milchsäurebildung	Hemmung Gesamtumsatz
		10^{-2} n HCN	10^{-2} n NaF		mg	vorher mg	nachher mg	mg		Proz.
1	19. XII.	—	—	60′,	0,31	0,596	0,438	0,204	0,514	—
		8	—	60	0,10	—	0,490	0,135	0,235	65
		1,6	—	60	0,37	—	—	—	—	—
		—	1	60	0,17	—	0,157	0,56	0,73	—
		8	1	60	0,03	—	0,465	0,141	0,17	76
2	20. XII.	—	—	60	0,45	0,530	0,380	0,19	0,64	—
		—	5	60	0,125	—	0,227	0,39	0,515	—
		8	5	60	0,0	—	0,413	0,15	0,15	71

III. Vergleichende Betrachtung der Kohlehydratvergärung durch Hefepräparate (Acetonhefe und Mazerationssaft).

Harden und *Young* haben in ihren grundlegenden Arbeiten, in denen sie die Rolle der Phosphate bei der alkoholischen Gärung klarstellten, die beiden getrennten Phasen der Gärung entdeckt, von denen die erste, rasche, der Veresterung eines Zuckermoleküls unter gleichzeitigem Zerfall eines zweiten entspricht, die zweite Phase aber der Wiederaufspaltung des Esters. Die erste *Harden-Young*sche Gleichung

$$2\,C_6H_{12}O_6 + 2\,PO_4HR_2 = 2\,CO_2 + 2\,C_2H_5OH + 2\,H_2O + C_6H_{10}O_4(PO_4R_2)_2 \qquad (1)$$

drückt die genau hälftige Teilung der Zuckermoleküle in zerfallende und veresternde aus; durch die zweite Gleichung

$$C_6H_{10}O_4(PO_4R_2)_2 = 2\,H_2O = C_6H_{12}O_6 + 2\,PO_4HR_2 \qquad (2)$$

wird diejenige Reaktion angegeben, die die Gärgeschwindigkeit der zweiten Periode bestimmt. Um den Gärverlauf selbst in dieser Periode wiederzugeben, muß hieran noch einmal die Gleichung 1 angefügt werden, da die Gärung nur unter Wiederveresterung des frei kommenden Phosphats (bei Überschuß von Zucker) oder frei kommenden Zuckers (bei Überschuß an Phosphat) fortschreiten soll. Während die Reaktion 1 der Cozymase bedarf, kann die Reaktion 2 ohne diese vonstatten gehen, nicht aber die anschließende Gärung, die nach Gleichung 1 verläuft. So weit die Erklärung von *Harden* und *Young*.

Daß die erste der beiden Gleichungen nur eine Bilanz wiedergibt und daß irgend ein Intermediärprodukt postuliert werden muß, durch das die Spaltungs- und Veresterungsreaktion miteinander verknüpft werden, ist weder *Harden* selbst noch den späteren Autoren, die sich mit dem Gegenstand beschäftigt haben, entgangen; doch ist diese Lücke bislang nur durch spekulative Betrachtungen ausgefüllt. Die vollkommene Übereinstimmung der Kinetik der Milchsäurebildung im Muskelextrakt und der Zymasegärung läßt keinen Zweifel, daß das postulierte Intermediärprodukt beide Male dasselbe ist und daß die Verbindung von Veresterung und Zerfall auch auf dem gleichen Mechanismus beruht. Da nun aber die Hexosediphosphorsäure ohne Coferment zu Milchsäure aufgespalten wird und auch von solchen Extrakten, die zur Veresterung von Kohlehydrat nicht mehr imstande sind (z. B. Froschmuskelextrakt nach 15 Minuten langem Erwärmen auf 37^0), so kann hier die Spaltung des Esters nicht auf dem komplizierten Wege über Hydrolyse und Wiederveresterung erfolgen. Demnach muß die sich anhäufende Hexosediphosphorsäure den stabilisierten Rest darstellen, der bei der Aufspaltung der Kohlehydrate dem Zerfall entgangen ist, während zunächst das ganze in Reaktion tretende Kohlehydrat verestert wurde. Dies ergibt sich weiter auch durch die Veresterung in Gegenwart von Fluorid, wo parallel mit der Hemmung der Milchsäurebildung eine entsprechende Anreicherung der Hexosediphosphorsäure stattfindet. Das Verhältnis zwischen Anhäufung von Ester und Spaltung in Milchsäure ist daher im allgemeinen beliebig, und nur im Falle der Hexosenspaltung im Muskelextrakt unter Aktivatorzusatz ergibt sich die genau hälftige Teilung der Zuckermoleküle in zerfallende und veresternde. Sollen die mit dem Muskelextrakt gewonnenen Ergebnisse für die Gärung im Hefeextrakt Geltung haben, so ist zu fragen:

a) ob auch bei der Gärung die genau hälftige Teilung der Zuckermoleküle nur einen Spezialfall für die Hexosen darstellt,

b) ob es mit geeigneten Fluoridkonzentrationen gelingt, die Veresterung von der Gärung völlig zu trennen,

c) ob ebenso wie im Muskelextrakt die Hexosediphosphorsäure direkt vergoren werden kann, einmal von solchen Hefepräparaten, die durch Alter oder sonstige Beeinträchtigung des Enzymkomplexes zur Zuckerspaltung nicht mehr imstande sind, zweitens, ob diese Vergärung auch in Abwesenheits des Coferments gelingt.

Der Umstand, daß diese sämtlichen Fragen durch den Versuch mit ja beantwortet werden, ist ein starkes Argument zugunsten der hier vertretenen Vorstellung. In einer in kurzem folgenden Arbeit wird diese völlige Übereinstimmung zwischen der Zuckerspaltung im Muskel-

und Hefeextrakt auch am Umsatz der Hexosemonophosphorsäuren demonstriert werden[1]).

A. Hälftige Teilung des Zuckers.

Wie steht es nun mit der hälftigen Teilung der Zuckermoleküle in veresternde und vergärende? Daß diese Proportion für die Hexosen genau zutrifft, ist von *Harden* und *Young* bereits gezeigt worden. Auch *Euler* und *Johansson*[2]) bestätigten dies Resultat für den Gesamtumsatz, fanden aber im Beginn ein Überwiegen der Veresterung. Der weitere Befund von *Euler*, *Ohlsén* und *Johansson*[3]), daß Mazerationssäfte bestimmter Stockholmer Hefen Zucker nur verestern, aber nicht vergären, wird in seiner Beweiskraft von *Harden* bezweifelt, da der gebildete Ester möglicherweise keine Hexosediphosphorsäure sei[4]).

Für Glucose und Fructose ist in den Mazerationssäften aus Berliner Unterhefen die *Harden-Young*sche Gleichung während der Phosphatperiode genau erfüllt, wenn man, wie es geschehen muß, die kontinuierliche Wiederaufspaltung der gebildeten Hexosediphosphorsäure in jedem Moment in Rechnung zieht. Auch für den Anfangsteil besteht eine vollständige Symmetrie (s. Abb. 18, wo die Angärung der Fructose dargestellt ist), so daß insbesondere der Gäranstieg nicht auf ein Vorauseilen der Veresterung zurückgeführt werden kann. Auch mit Natriumfluorid gelingt es nur sehr unvollkommen, die Veresterung der Glucose von der Gärung zu trennen, da, wie schon *Euler* bei ähnlichen Versuchen beobachtete, beide annähernd gleich stark gehemmt werden. Die Gärversuche mit Mazerationssaft wurden nach der *Warburg*schen Methode in Gefäßen von etwa 20 ccm ausgeführt unter Füllung des Gasraums mit N_2, 5 proz. CO_2[5]). Einige Versuche, die die Gültigkeit der *Harden-Young*schen Proportion während der Phosphatperiode zeigen, sind in der Tabelle XII angeführt (Temperatur 28°).

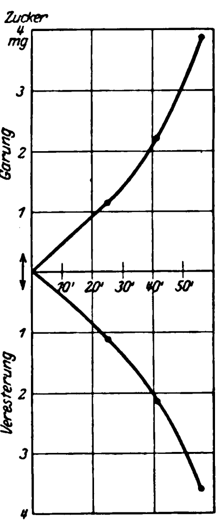


Abb. 18.
Fructosegärung im Hefemazerationssaft zu Beginn der Phosphatperiode. Vergärung in mg Zucker (aus CO_2-Bildung bestimmt) nach oben; Veresterung (bestimmt durch Änderung des Phosphatgehalts) nach unten aufgetragen.
Der Verlauf beider Kurven ist vollständig symmetrisch (Versuch 27. X. 1926).

[1]) Siehe vorläufige Mitteilung *O. Meyerhof* und *K. Lohmann*, Naturw. **14**, 1277, Dezember 1926.
[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **85**, 192, 1913.
[3]) Ebendaselbst **76**, 468, 1912; diese Zeitschr. **84**, 492, 1917.
[4]) *Harden*, Alcoholic Fermentation, 3. Aufl., S. 60. London 1923.
[5]) Siehe diese Zeitschr. **162**, 79, 1925.

Tabelle XII.

Nr.	Datum	Gesamtflüssigkeit ccm	Vorhandene Zuckermenge mg	Zeit	Vergorener Zucker (aus CO_2-Messung) mg	P_2O_5-Gehalt vorher mg	P_2O_5-Gehalt nachher mg	Veresterter Zucker mg	Zuckerveresterung / Zuckervergärung	Bemerkungen
1	20. V.	0,75	5 mg Glucose	90′	1,16	3,24	2,32	1,13	0,98	Anfang der Phosphatperiode
2	27. X.	0,9	20 mg Fructose	26	1,15	4,37	3,52	1,09	0,95	Hauptteil der Phosphatperiode
				41	2,26		2,73	2,10	0,93	
				56	3,87		1,58	3,58	0,93	
3	16. X.	1,0	30 mg Fructose	3h	3,2	4,28	2,05	2,85	0,89	Induktionszeit 1h30′
				$3^1/_2$h	5,8		0,37	5,0	0,86	Mitte d. Phosphatperiode
				5h	7,4		<0,10	5,38	—	Ende der 1. Phase

Ganz anders verhält sich aber die Vergärung der Polysaccharide. Hier häuft sich nämlich in der ersten Stunde drei- bis viermal so viel Zucker als Hexosediphosphorsäure an, wie Glucosegruppen vergären, und erst in längerer Zeit wird der angehäufte Ester allmählich wieder gespalten. Wenn man nach der Berechnungsweise von *Harden* und *Young* für die Aufspaltung einen konstanten Betrag der Gärung in Abzug bringt, so wird das Mißverhältnis zwischen Esteranreicherung und Kohlensäurebildung noch erheblich größer. Der Einwand, daß der gebildete Ester auch hier möglicherweise keine Hexosediphosphorsäure wäre, läßt sich auf überzeugende Weise widerlegen durch die Wirkung des Natriumarseniats. Schon *Harden* hat beobachtet, daß das Natriumarseniat die Vergärung des Glykogens um das Vierfache steigern kann, dies aber als eine Wirkung auf die Glykogenhydrolyse angesehen[1]). Die gleichzeitige Bestimmung der Kohlensäurebildung und Phosphatveresterung führt aber zu einer sehr einfachen Erklärung der Arseniatwirkung; es wird nämlich dabei die sich sonst bei der Glykogenvergärung anhäufende Hexosediphosphorsäure aufgespalten. Daher setzt 1. die Steigerung der Glykogenspaltung durch Arseniat erst allmählich mit der Anhäufung des Hexosediphosphats ein, während die Gärung zugesetzten Hexosediphosphats durch Arseniat von Anfang an beschleunigt wird; 2. ist während der beschleunigten Gärperiode die mehr gebildete Kohlensäure äquimolekular mit dem weniger veresterten bzw. mehr aufgespaltenen Phosphat. Hieraus ergibt sich also gleichzeitig, daß wirklich Hexosediphosphat angehäuft war, das unter der

[1]) Siehe Alcoholic Fermentation, 3. Aufl., S. 128.



Arseniatwirkung aufgespalten wird. Auch zeigen Versuche mit *Robison*scher und *Neuberg*scher Hexosemonophosphorsäure, daß deren Aufspaltung durch Arseniat anfänglich nicht beschleunigt wird, sondern erst nach Umlagerung der Monoester in die *Harden-Young*sche Säure. Die Wirkung des Arseniats auf die Vergärung des Glykogens ist in Abb. 19 wiedergegeben und auch in der folgenden Tabelle XIII, Versuch 1a, b, c und 6a und b aufgeführt.

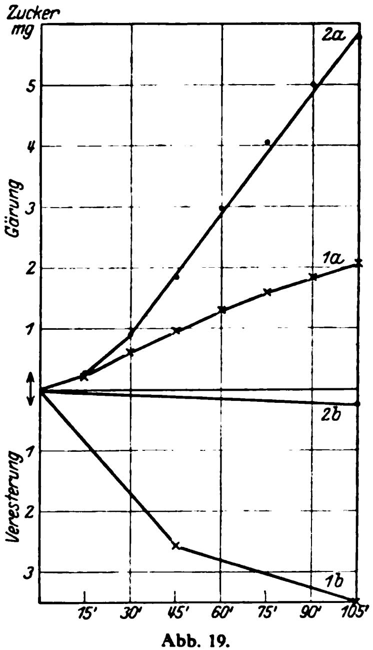


Abb. 19.
(Versuch 5. November 1926.)
Vergärung von Glykogen mit und ohne Arseniat mit gleichzeitiger Messung der Veresterung.
1a: Vergärung des Glykogens ohne Zusatz.
1b: Veresterung des Glykogens ohne Zusatz.
2a: Vergärung von Glykogen in Gegenwart von Arseniat.
2b: Veresterung von Glykogen in Gegenwart von Arseniat.
Das Plus an Vergärung entspricht genau einem Minus an Veresterung.

B. Einfluß des Fluorids.

In genau gleiche Richtung weist das Verhalten des Natriumfluorids, denn ähnlich wie bei der Milchsäurebildung im Muskelextrakt gelingt es zwar nicht mit den Hexosen, wohl aber mit Glykogen, durch NaF Veresterung und Vergärung zu trennen. Die Vergärung wird durch n/250 bis n/1000 NaF nahezu aufgehoben, die Veresterung aber nur teilweise gehemmt. Würde diese letztere gar nicht gehemmt werden, müßte sich, wie bei der Milchsäurebildung im Muskelextrakt, die Hexosediphosphorsäure stärker anhäufen als ohne Fluorid, was aber hier nicht beobachtet wird. Eine Übersicht ist in der Tabelle XIII gegeben, wo in der letzten Spalte das Verhältnis

$$\frac{\text{Moleküle Zucker verestert}}{\text{Moleküle Zucker vergoren}}$$

angegeben ist, das nach *Harden-Young* weit unter 1 sein müßte, weil neben der Veresterung ja die Wiederaufspaltung des gebildeten Esters verläuft, so daß bei der langsamen Gärgeschwindigkeit des Glykogens überhaupt keine Zunahme der Hexosediphosphorsäure zu erwarten wäre. Tatsächlich ist das Verhältnis aber in den ersten 1 bis 1½ Stunden 2 bis 4, in Gegenwart von Fluorid noch beliebig größer. Späterhin sinkt es infolge Wiederaufspaltung des Esters langsam ab. Zum Vergleich sind auch einige Versuche mit Zucker angegeben, die der *Harden-Young*schen Gleichung folgen. Bei Hemmung der Zuckerspaltung durch

Tabelle XIII. Veresterung und Vergärung der Polysaccharide.

Nr.	Datum	Mazerationssaft ccm	Kohlehydrat	Zeit	Zusätze	Vergorener Zucker mg	P_2O_5-Gehalt vorher mg	P_2O_5-Gehalt nachher mg	Veresterter Zucker mg	Veresterungsdifferenz gegen Kontrolle mg	Proportion: Zuckerveresterung / Zuckervergärung
1a	5. XI.	0,5	8 mg Glykogen	45′	—	0,94	4,71	2,73	2,54	—	2,7
b			8 „ „	1h45	—	2 06	4.71	2,01	8,45	—	1,7
c			8 „ „	1 45	0,004 mol. Arseniat	5,70	4,71	4,44	0,84	– 3,13	0
d			8 „ „	45	0,001 n NaF	0.10	4,71	3,84	1,05	– 1,49	10,5
e			8 „ „	1 45	0,001 n NaF	0,85	4,71	2,79	2,45	– 1,00	7,0
f			8 „ „	1 45	0,004 n NaF	0,07	4,71	2,73	2,54	– 0,91	36
2a	28. V.	0,5	5 mg Traubenzucker	2 30	—	1,60	2.90	1,69	1,55	—	1,0
b			5 „ „	2 30	0,0025 n NaF	0,02	2,90	2,83	0,10	– 1,45	—
c			5 „ „	2 30	0,0005 n NaF	0,22	2.90	2,69	0,25	– 1,30	1,0
d			4 mg Glykogen	3	—	0 52	2,90	2,17	0 94	—	1,8
e			4 „ „	3	0,0025 n NaF	0 045	2,90	2,34	0,72	– 0,22	16
f			4 mg Stärke	3	—	0 45	2,90	2,46	0 56	—	1,25
g			4 „ „	3	0,0025 n NaF	0,045	2,90	2,48	0,54	– 0,02	12
3a	31. V.	0,5	4 mg Glykogen	80	—	0 82	4,125	3,14	1,26	—	4,0
b			4 „ „	80	0,0025 n NaF	0,015	4,125	3,33	1,02	– 0,24	70
4a	4. XI.	0,5	20 mg Saccharose	50	—	6.47	4,20	0 1	5 8	—	0,8
b			20 „ „	50	0,0016 n NaF	0 08	4,20	4,12	0.10	– 5,2	1
c			8 „ Glykogen	2 30	—	2 86	4,20	1,86	8,0	—	1,06
d			8 „ „	2 30	0,0016 n NaF	1,24	4,20	1.845	8,0	0,0	2,4
5a	6. XII.	1,0	16 mg Glykogen	90	—	2,22	11,2	7,68	5 02	—	2,3
b			16 „ „	90	0,007 n NaF	0,04	11,2	8,92	2,92	– 2,10	70
6a	5. I.	0,5	4 mg Glykogen	1 20	—	1,29	5,56	3 88	– 2,18	—	1,7
b			4 „ „	1 20	0,008 mol. Arseniat	1,81	5,56	4,96	– 0,76	– 1,87	0,4

Fluorid wird auch die Veresterung gehemmt. Der kleine, übrig gebliebene Rest muß auf Bindung des präformierten Glykogens in dem nicht ganz kohlehydratfreien Mazerationssaft bezogen werden und findet sich auch in Extrakten, die ohne Zusatz von Kohlehydrat unter Fluorideinwirkung gesetzt werden.

Diese Versuche lassen sich noch auf indirekte Weise bestätigen. Zusammen mit *J. Suranyi* wurde gezeigt[1]), daß die Hexosediphosphorsäure eine stärkere Säure als Phosphorsäure ist, und daß bei der Veresterung des Phosphats im Muskelextrakt eine aus der Differenz der Dissoziationskonstanten berechenbare Säuerung stattfindet. Dasselbe ist auch bei der Gärung der Fall. Vertreibt man die Kohlensäure durch Schütteln, so ist diese Zunahme an Ester die einzigeUrsache der Säuerung. Nun erfährt ein mit Glykogen und Fluorid versetzter Mazerationssaft in 1 bis 2 Stunden eine Zunahme der Acidität etwa ebenso groß wie ohne Fluorid, obwohl die Gärung völlig gehemmt ist, andererseits aber mit Glykogen und Arseniat eine erheblich geringere, entsprechend der geringeren Veresterung. Dies ersieht man aus dem folgenden Beispiel (durch Arseniat wurde hier wie gelegentlich in schlechter gärenden Mazerationssäften die Vergärung des Glykogens nicht gesteigert).

Tabelle XIV.

p_H-Verschiebung bei Veresterung des Phosphats im Hefemazerationssaft. Versuch 6. Dezember 1926. Vergärung von Glykogen. Versuchszeit 90 Minuten.

Zusätze	Zucker vergoren mg	P_2O_5 Gehalt	P_2O_5 Änderung	Zucker verestert mg	p_H	p_H-Verschiebung
Vorher	—	11,20	—	—	6,18	—
Kein Zusatz . . .	2,22	7,68	— 3,92	5,02	5,92	— 0,26
0,006 n NaF . . .	0,04	8,92	— 2,28	2,92	5,95	— 0,23
0,004 mol. Natriumarseniat	1,90	10,24	— 0,96	1,23	6,11	— 0,07

C. Die Vergärung der Hexosediphosphorsäure.

Die in der vorhergehenden Arbeit mitgeteilten Tatsachen führten zu dem Schluß, daß die Hexosediphosphorsäure die stabilisierte Form des Intermediärprodukts der Kohlehydratspaltung ist, als solches

1. langsamer reagiert als der naszierende Ester,
2. durch ein Ferment gespalten wird, das weniger empfindlich ist als das veresternde, und
3. zu seinem Zerfall des für die Veresterung benötigten Coferments nicht bedarf.

[1]) Diese Zeitschr. 178, 427, 1926.

Es bleibt zu zeigen, daß die Punkte 1 bis 3 auch für die *Vergärung* der Hexosediphosphorsäure Geltung haben.

1. Daß die Vergärung der Hexosediphosphorsäure so viel langsamer erfolgt als die des Zuckers, ist bekannt und bedarf keiner weiteren Belege. Aber von Interesse ist, daß sie von vornherein mit einer konstanten Geschwindigkeit einsetzt, ohne Induktionsperiode und ohne Gäranstieg. Die primäre Aufspaltung des Esters und nicht das Auftreten geeigneter Wasserstoffakzeptoren bestimmt die Gärgeschwindigkeit. Diese wird daher im Gegensatz zur Vergärung der Hexosen und Polysaccharide durch Aldehyd nicht gesteigert, wohl aber außerordentlich durch Natriumarseniat.

2. Daß Hefepräparate, die unfähig sind Hexosen zu spalten, noch Hexosediphosphorsäure vergären, läßt sich leicht zeigen. In derart beschränkt wirksamen Säften kann sogar die Vergärung der Hexosediphosphorsäure noch durch Natriumarseniat stark stimuliert werden. Nachdem früher beobachtet war, daß die Induktionsperiode bei der Vergärung der Zymohexosen durch Hexosediphosphat aufgehoben werden kann[1]), wurde, um die Angärung nicht zu verzögern, stets etwas Hexosediphosphat zum Hexosengärgemisch zugegeben. Aber in schlechteren Säften kam die Zuckervergärung dadurch doch nicht in Gang, sondern die Geschwindigkeit entsprach nur der Gärung der Spur zugefügten Hexosephosphats, während dies selbst in höherer Konzentration deutlich vergoren wurde. Als Beispiel sei ein Versuch mit Extrakt aus alter, nicht gut getrockneter Trockenhefe gegeben.

Versuch 17. Juli 1926. 28° in 2 Stunden 10 Minuten mit 0,5 ccm Saft:

	Umsatz in cmm CO_2
Mit 1 Proz. Glucose	0
„ 1 Proz. Glucose + 0,02 Proz. Mg-Hexosephosphat	11,5
„ 1 Proz. Glucose + 0,02 Proz. Mg-Hexosephosph. + n/400 Aldehyd	16,0
„ 1,1 Proz. Mg-Hexosephosphat	100
„ 1,1 Proz. Mg-Hexosephosphat + 0,003 mol Natriumarseniat	592

3. Der wichtigste Punkt dürfte die Vergärung der Hexosediphosphorsäure in Abwesenheit des Coferments sein, denn nach der Auffassung von *Harden* und *Young* erscheint dies unmöglich, weil ja nach dieser die Vergärung der Hexosediphosphorsäure auf dem Umweg über die erste Gärungsgleichung stattfinden soll. Nun haben die englischen Forscher selbst Versuche mit Acetonhefe (Zymin) angestellt, die durch mehrmaliges Waschen von Coferment befreit wurde[2]). Durch dieses

[1]) Zeitschr. f. phys. Chem. **102**, 185, 1918.

[2]) Proc. Roy. Soc. Ser. B. **82**, 321, 1910.



gewaschene Zymin wurde das Hexosediphosphat zum Teil in anorganisches Phosphat und gärfähige Hexose gespalten, zum anderen Teil aber entstand nach den Versuchsprotokollen der Autoren Gärungskohlensäure bis zur Hälfte der bei totalem Umsatz möglichen Menge. Diese letztere Beobachtung haben *Harden* und *Young* wohl nur deshalb außer acht gelassen, weil sie nicht sicher waren, das Coferment vollständig entfernt zu haben. In meinen eigenen Versuchen wurde durch zweimaliges Waschen von Acetonhefe auf der Zentrifuge mit größeren Mengen Wassers das Coferment so weit entfernt, daß Zucker in Phosphatlösung ohne gleichzeitige Zugabe von Hefekochsaft durch die Acetonhefe nicht mehr vergoren wurde. Eine derartige Acetonhefesuspension von 0,5 bis 1 g, zweimal mit je 40 ccm Wasser gewaschen und wieder auf ein kleines Volumen aufgefüllt, vergärt Glucose und Fructose auch nicht nach Zugabe von etwas Hexosephosphat, wohl aber das Hexosephosphat selbst, und zwar wenig schwächer als eine gleich konzentrierte, ungewaschene Suspension. Gibt man aber Kochsaft hinzu, so wird jetzt Glucose ungefähr ebenso rasch wie die Ausgangssuspension vergoren und das Hexosephosphat ein wenig stärker als die Suspension ohne Kochsaft. Dieser Unterschied rührt zum kleinen Teil von der Gärung der im Kochsaft vorhandenen Kohlehydrate, zum größeren aber von der zusätzlichen Vergärung des bei der Esterhydrolyse gebildeten Zuckers her. Von unserem Standpunkt erscheint diese Zusatzgärung weniger interessant als das Faktum, daß hier offenbar eine Vergärung von Hexosediphosphorsäure in Abwesenheit des Coferments vorliegt (s. Abb. 20). Nun wird allerdings bei weiterem Waschen auch schließlich die Gärung der Hexosediphosphorsäure zum Verschwinden gebracht und kann durch Zugabe von Kochsaft nachher noch zu einem kleinen Teile restitutiert werden. Schließt man hieraus, daß durch das zweimalige Waschen das Coferment nicht restlos entfernt wurde, so würde auch die Gärung des Hexosephosphats

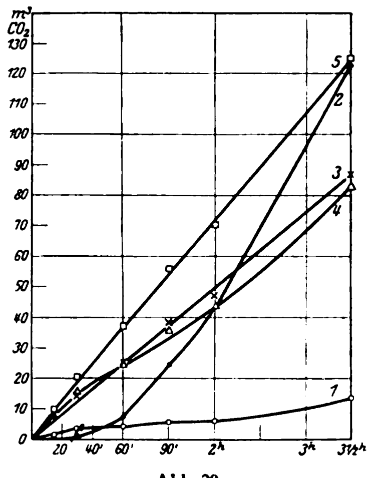


Abb. 20.
Vergärung von Glucose und Hexosediphosphat durch Acetonhefe in Gegenwart und Abwesenheit von Coferment. (Versuch 12. VII. 1926 Tabelle XV, 1).

⊙——⊙ 1.: Glucoseumsatz durch gewaschene Acetonhefe ohne Kochsaft.

●——● 2.: Vergärung von Glucose durch gewaschene Acetonhefe nach Zusatz von Kochsaft.

×——× 3.: Vergärung v. Hexosephosphat durch nicht gewaschene Acetonhefe.

△——△ 4.: Vergärung v. Hexosephosphat d. gewaschene Acetonhefe ohne Kochsaft.

⊡——⊡ 5.: Vergärung v. Hexosephosphat d. gewaschene Acetonhefe mit Kochsaft.

noch einer Spur der Cozymase bedürfen, die aber um das Vielfache geringer wäre als die für die Zuckergärung benötigte Menge. Wahrscheinlicher jedoch ist, daß durch zu häufiges Waschen das Enzym selbst geschädigt wird. Jedenfalls ist das Verhalten völlig analog der Hexosephosphatspaltung im Muskelextrakt. Auch hier darf der Extrakt nicht beliebig lang dialysiert werden; aber auch hier ist die Kohlehydratspaltung schon lange erloschen, wenn die Spaltung des Hexosephosphats nur wenig geschwächt wird, und auch hier läßt sich durch Kochsaft die erstere fast völlig restituieren, während die Spaltung des Esters dadurch nur schwach gesteigert wird.

Nach Entfernung des Coferments wird die Vergärung der Hexosediphosphorsäure durch Arseniat nicht mehr beschleunigt; dagegen läßt sich diese Beschleunigung durch Zusatz von Kochsaft restituieren. Möglicherweise bedarf es also für die Wirkung des Arseniats des Coferments, falls hier nicht sekundäre Einflüsse im Spiele sind. Jedenfalls beeinflußt in Abwesenheit des Coferments das Arseniat ebensowenig die Abspaltung des Phosphats wie die Gärung, so daß auch hierdurch keine Trennung der Hydrolyse vom vollständigen Zerfall des Esters herbeigeführt wird.

In mehreren dieser Versuche wurde gleichzeitig der Phosphatumsatz bestimmt. Für die Hexosephosphatspaltung gewaschener Acetonhefe ergibt sich unter Zugabe von Kochsaft eine recht genaue Äquimolekularität von Phosphat- und Kohlensäurebildung sowohl mit wie ohne Arseniat, ganz entsprechend der kompletten Aufspaltung des Esters; dagegen kann ohne Kochsaft die Phosphatabspaltung die gleichzeitige Gärung bis auf etwa das Doppelte übertreffen. Dies entspricht der neben der direkten Vergärung stattfindenden hydrolytischen Spaltung, die in Anwesenheit von Kochsaft durch Vergärung nach der ersten *Harden*schen Gleichung unsichtbar gemacht wird. Eine Reihe von Versuchen über die cofermentfreie Vergärung der Hexosediphosphorsäure enthält Tabelle XV.

Der Versuch 3 zeigt, daß Aldehyd die Traubenzuckergärung enorm steigert, aber nur in Anwesenheit von Coferment, während es auf Hexosephosphat ohne Wirkung ist. *Harden*[1]) hat die Angabe gemacht, daß das Coferment sich in Acetonpräparaten aus englischen Oberhefen durch Kaliumphosphat + Aldehyd ersetzen ließe und in Zusammenhang damit geschlossen, daß die Cozymase ähnlich den Aldehyden in den „Oxydoreduktionsvorgang“ der Gärung eingriffe. Dieser Schluß scheint jedoch auf Grund der völligen Übereinstimmung der Cozymasenrolle bei der Gärung und Milchsäurebildung wenig

[1]) Biochem. Journ. 11, 64, 1917; Alcoholic Fermentation, 3. Aufl., S. 71f.



Tabelle XV. Vergärung der Hexosediphosphorsäure. 20°. 1 ccm Flüssigkeit.

Nr.	Datum	Acetonhefe mg	Vorbehandlung	Zusätze	Glucose Proz.	Hexose-phosphat Proz.	Versuchs-zeit	CO_2 cmm
1a	12. VII.	30	keine	—	1,0	0,01	3h30'	123
b		30	"	—	—	1,0	3 30	86,5
c		50	2 mal gewaschen	—	—	—	3 30	11,2
d		50	2 " "	—	1,0	0,01	3 30	13,1
e		50	2 " "	—	—	1,0	3 30	82,7
f		50	2 " "	0,35 ccm Kochsaft	—	—	3 30	14,7
g		50	2 " "	0,35 " "	1,0	0,01	3 30	127
h		50	2 " "	0,35 " "	—	1,0	3 30	125
2a	13. VII.	70	2 mal gewaschen	—	—	—	90	3,1
b		70	2 " "	—	0,5	0,02	90	3,9
c		70	2 " "	—	—	0,8	90	39,7
d		70	2 " "	0,007 mol. Natrium-Arseniat	—	0,8	90	46,2
e		70	2 " "	0,35 ccm Kochsaft	—	—	90	5,6
f		70	2 " "	0,35 " "	0,5	0,02	90	68,7
g		70	2 " "	0,35 " "	—	0,8	90	66,4
h		70	2 " "	0,35 ccm Kochsaft + 0,007 mol. Natrium-Arseniat	—	0,8	90	352
3a	15. VII.	60	keine	—	—	—	62	4,6
b		60	"	—	1,0	0,02	62	79,2
c		60	"	0,01 mol. Acetaldehyd	1,0	0,02	62	218
d		60	"	—	—	0,8	62	88,7
e		60	"	0,01 mol. Acetaldehyd	—	0,8	62	83
f		60	2 mal gewaschen	—	—	—	1 05	9,5
g		60	2 " "	0,005 mol. Acetaldehyd	1,0	0,02	1 05	9,7
h		60	2 " "	—	—	1,1	1 05	49,4
i		60	2 " "	0,05 mol. Acetaldehyd	—	1,1	1 05	50
k		60	2 " "	0,3 ccm Kochsaft	—	—	1 05	8,3
l		60	2 " "	0,3 ccm Kochsaft + 0,05 mol. Acetaldehyd	1,0	0,02	1 05	406
m		60	2 " "	0,3 ccm Kochsaft	—	1,1	1 05	85,2

wahrscheinlich. Darüber hinaus ist auch der von *Harden* beschriebene Effekt von Kaliumphosphat + Aldehyd an den Präparaten aus deutschen Unterhefen nicht zu reproduzieren. Möglicherweise bleibt doch in den Oberhefepräparaten von Harden noch ein Rest von Coenzym zurück, das dann durch Aldehyd kräftig aktiviert werden kann.

Nach der hier vertretenen Ansicht entspricht die zweite Gärungsphase genau der zweiten Phase der Milchsäurebildung. Der Gärungsabfall nach der Phosphatperiode beruht danach nicht auf der Umschaltung der beherrschenden Reaktionsgeschwindigkeit (Controling factor von *Harden*) von der Veresterung auf die hydrolytische Spaltung des Esters, sondern von der Vergärung des naszierenden Esters auf die Vergärung des stabilisierten Esters. Hierzu addiert sich dann noch die Hydrolyse, die aber ähnlich wie beim Muskelextrakt auf ein allmähliches Versagen des Gärungsferments zurückgeführt werden kann. Die zwischen der Milchsäurebildung und der alkoholischen Gärung noch übrigbleibenden Unterschiede der Kinetik beruhen nur zum Teil auf dem verschiedenen Chemismus, zum anderen Teile auf der sehr verschiedenen Stabilität der Fermente, den großen Unterschieden in der Konzentration der wirksamen Bestandteile, wie Phosphat, Coferment, Zucker und ähnlichem.

Zusammenfassung.

1. Von dem milchsäurebildenden Ferment des Muskels in Lösung werden die gärfähigen Hexosen unmittelbar sehr viel schwächer in Milchsäure gespalten als die Polysaccharide, relativ am besten von frischem Kaninchenmuskelextrakt.

2. Fügt man jedoch einen durch alkoholische Fällung von Hefeautolysat gewonnenen Aktivator hinzu, so werden die Hexosen mit großer Geschwindigkeit umgesetzt, wobei sie zur Hälfte in Milchsäure gespalten, zur anderen Hälfte verestert werden. Sobald entweder das Phosphat oder der freie Zucker verbraucht ist, fällt die Geschwindigkeit der Milchsäurebildung ab und entspricht nunmehr der Aufspaltung der gebildeten Hexosediphosphorsäure in äquimolekulare Mengen Milchsäure und Phosphorsäure. Die Milchsäurebildung in der ersten Phase ist daher dem vorhandenen anorganischen Phosphat proportional und läßt sich nach Veresterung desselben durch neue Phosphatzugabe wieder steigern. Durch kleine Konzentrationen von Arseniat wird die Spaltungsgeschwindigkeit der Hexosediphosphorsäure beträchtlich erhöht; etwas geringer auch die Spaltung der Polysaccharide und der Hexosen in derjenigen Phase, wo sich Hexosediphosphorsäure anhäuft.

3. Der in die Augen springende Parallelismus des Hexoseumsatzes im Muskelextrakt mit dem der alkoholischen Gärung im Hefeextrakt wird noch vervollständigt durch folgende neu gefundene Eigentümlich-

keiten des Gärungsablaufs: Nur die Hexosen werden entsprechend der *Harden-Young*schen Gleichung genau im Verhältnis 1 : 1 verestert und gespalten. Dagegen häuft sich bei der Vergärung des Glykogens und der Stärke in der ersten Zeit das Mehrfache an Hexosediphosphat an als vergärt. Hierauf ist die starke Steigerung der Glykogenvergärung durch Arseniat zurückzuführen, da hiermit die sonst angehäufte Hexosediphosphorsäure aufgespalten wird. Durch Fluorid läßt sich die Veresterung des Glykogens von der Vergärung ähnlich trennen wie im Muskelextrakt. Die Hexosediphosphorsäure kann durch annähernd cofermentfreie Zymase (mehrfach gewaschene Acetonhefe) vergoren werden. Die Vergärung in der zweiten Phase vollzieht sich danach nicht unter hydrolytischer Spaltung des Esters und erneutem Umsatz der Spaltprodukte, sondern wie im Muskelextrakt unter direktem Zerfall der Hexosediphosphorsäure in die Endprodukte, während das Coferment nur für die Bildung des Phosphorsäureesters benötigt wird.

Über einige chemische Eigenschaften des Milchsäure bildenden Ferments im Muskel[1]).

Von

Karl Meyer.

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für Biologie, Berlin-Dahlem.)

(Eingegangen am 13. Januar 1927.)

Mit 1 Abbildung im Text.

Inhalt.

Nachdem es kürzlich gelungen ist[2]), das Milchsäure bildende Ferment des Muskels in Lösung zu überführen, konnten einige Fragen bezüglich der chemischen Komponenten des wirksamen Enzymkomplexes einer direkteren Bearbeitung unterzogen werden, als es bisher möglich war. Diese betreffen vor allem die weitere Isolierung der Bestandteile des Enzymsystems, die Reinigung des Coferments und des Ferments selbst. Während bekanntlich die Reinigung der hydrolysierenden Fermente vor allem dank der Arbeiten *Willstätters* und *von Eulers* schon große Fortschritte gemacht hat, ist bisher die

---

[1]) Die Arbeit wurde mit Unterstützung der Rockefellerstiftung ausgeführt, der ich dafür auch an dieser Stelle meinen Dank sage.

[2]) *O. Meyerhof*, diese Zeitschr. 178, 395, 1926.

weitere Isolierung solcher Fermente, die die energieliefernden Stoffwechselreaktionen katalysieren, nicht möglich gewesen. Das bisher hierin Erreichte bei der Zymase, dem Atmungsferment und neuerdings dem Milchsäure bildenden Ferment des Muskels beschränkt sich darauf, die Gesamtheit der wasserlöslichen Zellinhaltsstoffe durch Auspressen oder Extrahieren zu gewinnen und in diesem strukturlosen Gemisch die Anwesenheit des Fermentsystems zu demonstrieren. Ich halte es deshalb für einen Fortschritt, daß im folgenden nicht nur das Coferment, sondern das veresternde und Milchsäure bildende Ferment selbst zu einem erheblichen Teil von Eiweiß befreit werden konnte, so daß gegenüber stark wirksamen Extrakten eine 10- bis 20fache Konzentrierung der Wirksamkeit, bezogen auf den Eiweißgehalt, herbeigeführt wurde.

Die Arbeit, die auf Vorschlag und unter Leitung von Prof. *Meyerhof* ausgeführt wurde, beschäftigt sich in ihrem ersten Teil mit der Reinigung des Coferments und seiner Wirkung und im Anschluß daran mit der Frage, ob das Coferment der Milchsäurebildung auch ein Coferment der Atmung ist. Im dritten Teil wird die Frage nach einer Mitwirkung des Calciums für den Zuckerumsatz untersucht und schließlich im vierten Teil die Reinigung des Ferments selbst behandelt. Die Versuche dieses Abschnittes werden fortgesetzt.

I. Die Wirkung des gereinigten Coferments und die Unentbehrlichkeit des Phosphats für die Milchsäurebildung.

Die erste Frage betrifft die Wirkungsweise des Coferments der Milchsäurebildung. Das von *Harden* und *Young* entdeckte Coferment der alkoholischen Gärung[1]), das durch Dialyse bzw. Ultrafiltration des Hefesaftes oder auch durch Kochen von der Zymase getrennt werden kann, läßt sich, wie diese Autoren weiterhin zeigten, von anorganischem Phosphat sowie von Hexosediphosphorsäure befreien und so der Beweis erbringen, daß das Coferment (Cozymase) neben dem anorganischen und veresterten Phosphat einen notwendigen Bestandteil des Zymasekomplexes darstellt. Nachdem sich ergeben hatte, daß der Muskel und andere tierische Organe echte Cozymase enthalten[2]), und daß diese offenbar bei der Atmung sowie der Milchsäurebildung[3]) eine ähnliche Rolle spielt wie die Cozymase der Hefe bei der alkoholischen Gärung, war die Frage, ob sich auch hier auf den von *Harden*

---

[1]) Proc. Roy. Soc. B. **77**, 405, 1906.
[2]) *O. Meyerhof*, Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. **101**, 165, 1918; **102**, 1, 1918; vgl. auch die Bestätigung bei *Euler*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **123**, 90, 1922.
[3]) *O. Meyerhof*, Pflügers Arch. **175**, 20, 1919.

und *Young* eingeschlagenen sowie von *Euler* weiterhin verfolgten Wegen der direkte Beweis erbringen ließ, daß diese phosphatfreie Verbindung als echtes Coferment der Milchsäurebildung figuriert, und ob ferner zu ihrer Betätigung der Zusatz von anorganischem Phosphat ebenso nötig ist wie bei der alkoholischen Gärung. Daß das mehr oder weniger gereinigte Coferment der Muskulatur die alkoholische Gärung annähernd ebensogut aktiviert wie gereinigtes Coferment aus Hefe, ist schon früher gezeigt worden[1]).

Der Fermentextrakt der Muskulatur läßt sich auf mehrere Weise von Coferment befreien. Man kann sich dafür entweder mehrfacher Extraktion der Muskulatur bedienen, indem der dritte und vierte Extrakt zwar reichlich Milchsäure bildendes Ferment, aber nahezu kein Coferment mehr enthält[2]), oder auch der „klassischen Methode", der Dialyse. Auf der anderen Seite kann man als Ausgangsmaterial für die Reinigung des Muskelcoferments entweder das Dialysat, den gekochten oder filtrierten Muskelextrakt oder den Kochsaft aus Muskulatur wählen. Das Dialysat kommt wegen zu starker Verdünnung kaum in Betracht. Der Kochsaft des Extrakts hat gegenüber direktem Muskelkochsaft den Vorteil, fast kohlehydratfrei zu sein, doch ist der Muskelkochsaft selbst so viel reicher an Coferment, daß ich in der Regel diesen als Ausgangsmaterial gewählt habe.

Methoden.

Der Verlauf der Milchsäurebildung wurde manometrisch verfolgt[3]), wobei die speziell für die Glykolysemessung im Muskelextrakt angegebenen Vorschriften und Berechnungsmethoden Anwendung fanden[4]). Die Gesamtflüssigkeit pro Bestimmung betrug 0,9 bis 1 ccm, das Volumen der Glykolysegefäße 6 ccm. Der mit unterkühlter KCl-Lösung gewonnene Muskelextrakt wurde in Kollodiumschläuchen von Coferment und einem Teil des Phosphats befreit. Bei der großen Empfindlichkeit des Ferments mußte die Dialyse in unterkühlter Lösung bei 0 bis -2^0 geschehen. Die Kollodiumschläuche wurden nach der Vorschrift von *Brown*[5]) mit den von *Lundsgaard* und *Hollbøll*[6]) angegebenen Modifikationen angefertigt. Sie waren für Kristalloide so gut durchlässig, daß eine etwa 12 mm weite und 10 ccm fassende Hülse 1 proz. Glucose gegen 10 ccm destilliertes Wasser

[1]) *O. Meyerhof*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **102**, s. bes. S. 18, 1918.

[2]) *Derselbe*, diese Zeitschr. **178**, 395, 1926.

[3]) *O. Warburg*, ebendaselbst **142**, 317, 1923; **162**, 51, 1924; **164**, 481. 1925.

[4]) *O. Meyerhof*, ebendaselbst **178**, 395, 1926.

[5]) Biochem. Journ. **9**, 591, 1915.

[6]) Hospitals Tidende **68**, 849 und 866, 1925.

zu 46 Proz. in einer Stunde durchließ, was einem 90proz. Ausgleich entsprach. Die von mir benutzten Hülsen faßten im allgemeinen 6 ccm. Sie wurden auf einem Brettchen befestigt, das durch einen Motor mittels Exzenter auf und ab bewegt wurde. Die Hülse mit Brettchen befand sich in einer Schale mit KCl-Lösung, die sich in einem Kältegemisch von etwa — 3° befand. Eine sehr weitgehende Dialyse verträgt der Muskelextrakt auch nicht unter diesen Kautelen. Während er nach 40 Minuten noch gut reaktivierbar ist, kann er nach 60 Minuten und erst recht nach 80 Minuten langer Dialyse meist nur noch durch konzentrierten Kochsaft, aber nicht mehr durch verdünntes gereinigtes Coferment aktiviert werden. Doch reichen in der Regel 40 bis 60 Minuten aus, um das Coferment bis zur völligen Wirkungslosigkeit zu entfernen.

Die Reinigung des Coferments geschah nach verschiedenen Methoden. Stets wurde der Muskelkochsaft zunächst auf 50 Proz. Alkoholgehalt gebracht, das ausgeschiedene Glykogen wurde nach ½- bis 1stündigem Stehen der Lösung im Kältegemisch zentrifugiert. Zur Entfernung des Phosphats wurde in den ersten Versuchen nach den Angaben von *Harden* und *Young* der Alkohol durch Eindampfen vertrieben und dann neutrales Bleiacetat im Überschuß hinzugegeben. Nach Filtration wurde das Blei durch Schwefelwasserstoff entfernt und dieser durch Luftstrom vertrieben. Hieran wurden die von *Euler* angegebenen Reinigungsverfahren[1]) angeschlossen, die durch Adsorption an basisches Bleiacetat (von p_H etwa 9) oder an Aluminiumhydroxyd eine weitere Konzentrierung bezwecken. Während es allerdings so gelang, mit dem Muskelcoenzym Fraktionen zu gewinnen, die gewaschene Acetonhefe zur Gärung zu aktivieren vermochten, waren sie gegenüber dem empfindlicheren glykolytischen Ferment des Muskels wirkungslos. Das lag wohl zur Hauptsache, abgesehen von der Verdünnung des Coferments, an der Schädigung durch den hohen Salzgehalt der Lösung.

Ich versuchte, das Coferment durch Eindampfen bei 50° anzureichern und dann durch Abkühlung der Lösung bis auf — 2° einen Teil der Salze auszufällen. Aber auch jetzt war die Aktivierung des dialysierten Muskelextrakts ungenügend. Ich ging deshalb zu anderen Reinigungsmethoden über und entfernte das Phosphat durch Zusatz von Bariumchlorid bei etwa p_H 8. In der Regel wurden auf 8 ccm eingedampften, von Glykogen befreiten Muskelkochsaft 2 ccm n $BaCl_2$ verwandt. Das überschüssige Barium wurde zunächst durch Kohlensäure, dann nach Abfiltrieren des Carbonats durch vorsichtigen Zusatz von Schwefelsäure entfernt und die Lösung bei etwa 35° mit einem Fön eingedampft. Diese Lösungen erwiesen sich als wirksam, waren

[1]) Zeitschr. f. phys. Chem. **138**, 1, **139**, 281, 1924.



aber noch nicht phosphatfrei. Doch ließen sich die hier noch vorhandenen Spuren Phosphat entfernen, wenn man außer Bariumchlorid auch noch kolloides Eisenhydroxyd in Mengen von etwa 2 ccm 10proz. Sols hinzusetzte. Die so gewonnenen phosphatfreien Filtrate enthielten das Coferment des Muskels in genügender Konzentration ohne störende Beimengungen von anderen Salzen, um gegenüber dem dialysierten Muskelenzym wirksam zu sein. Mit ihnen ließ sich die Aufgabe, die Wirkung des Phosphats von der des Coferments vollständig zu trennen, erledigen.

Während ich davon absehe, die verschiedenen Etappen der Ausprobierung des hier benutzten Reinigungsverfahrens im einzelnen wiederzugeben, seien nur zwei Beispiele angeführt, um die Wirksamkeit sowohl des über das Bleiacetat, wie über Bariumchlorid und Eisenhydroxyd gereinigten Muskelcoenzyms auf die Gärung gewaschener Acetonhefe zu belegen.

1. Aktivierung der Gärung von Acetonhefe mittels des Bleifiltrats des Muskelkochsaftes. 39 ccm Muskelkochsaft + 40 ccm 96proz. Alkohol; Alkohol durch Eindampfen vertrieben, Filtrat mit Pb-Acetat gefällt; nach Entfernen des Pb durch H_2S ein Drittel des Filtrats eine Stunde lang bei etwa 35° eingedampft.

Versuch. 26. März 1926. 0,03 g gewaschene Acetonhefe geben in 30 Minuten mit 1,2 Proz. Glucose:

	CO_2 bei 20° cmm
a) Ohne Zusatz	2,2
b) Mit 0,4 ccm Muskelkochsaft . . .	78,2
c) Mit 0,4 ccm Pb-Filtrat	36,0

2. Aktivierung der Gärung von Acetonhefe durch über $BaCl_2$ und $Fe(OH)_3$ gereinigtes Coferment.

Versuch. 26. April 1926. 54 ccm Muskelkochsaft + 50 ccm Alkohol, nach Entfernen des Alkohols 8 ccm des Ausgangsextrakts mit 2 ccm n $BaCl_2$ + 2 ccm 10proz. $Fe(OH)_3$ versetzt. Nach Filtration Ba bei schwach alkalischer Reaktion mit CO_2, dann mit Schwefelsäure entfernt. 0,03 g gewaschene Acetonhefe geben in 60 Minuten mit 1,2 Proz. Glucose:

	CO_2 cmm
a) Ohne Zusatz	0,5
b) Mit 0,4 ccm Muskelkochsaft . . .	39,0
c) Mit 0,4 ccm Filtrat	42,0

Hinsichtlich der Bedeutung des Coferments für das Milchsäure bildende Ferment des Muskels war zuerst zu beweisen, daß tatsächlich bei der Dialyse des Muskelextrakts in das Dialysat eine Substanz übergeht, die mit der im Muskelkochsaft enthaltenen identisch ist, welche den inaktiven dialysierten Rückstand zur Milchsäurebildung befähigt. Dies ließ sich dadurch zeigen, daß der Muskelkochsaft diese Substanz ebenso durch Dialyse verliert.

Versuch 3. 28. Mai 1926. 6 ccm Extrakt gegen 0,9 Proz. KCl 60 Minuten bei — 2° dialysiert (a); 10 ccm Muskelkochsaft bei Eiskühlung 5 Stunden gegen 10 ccm destillierten Wassers dialysiert (b) und das Dialysat auf 3 ccm eingedampft; 6 ccm Muskelkochsaft bei Eiskühlung gegen 1 Liter destillierten Wassers dialysiert (c).

Je 0,3 ccm Muskelextrakt mit Bicarbonat, 0,45 Proz. Stärke und Zusätzen auf 0,9 ccm gebracht, bei 20° in 60 Minuten:

	CO_2 cmm
1. Unveränderter Muskelextrakt	85
2. Dialysierter Muskelextrakt (a)	5,1
3. Dialysierter Muskelextrakt (a) + 0,4 ccm Muskelkochsaft	69
4. Dialysierter Muskelextrakt (a) + 0,4 ccm dialysierter Muskelkochsaft (c)	7,4
5. Dialysierter Muskelextrakt (a) + 0,4 ccm eingeengtes Dialysat des Kochsaftes (b)	61

1 cmm CO_2 = 0,004 mg Milchsäure.

Wurde der Muskelkochsaft, wie oben angegeben, mit Alkohol von Glykogen, mit $BaCl_2$ und kolloidem Eisenhydroxyd von Phosphat befreit, so ließ sich das gereinigte Coferment der Milchsäurebildung darin nachweisen: dialysierter Muskelextrakt, mit Glykogen und Phosphat versetzt, war wirkungslos, wurde aber durch Zusatz des gereinigten Coferments aktiviert. Andererseits war aber auch Glykogen + Coferment wirkungslos, falls nicht Phosphat hinzugegeben wurde. Darüber hinaus zeigte sich, daß die Milchsäurebildung in einem gewissen Konzentrationsbereich mit Vermehrung des Phosphats stieg. Zu dieser Versuchsanordnung ist zu bemerken, daß zwar das Coferment vollständig von Phosphat befreit werden kann, nicht aber der dialysierte Fermentrückstand. Wird hier die Dialyse bis zur vollständigen Entfernung des Phosphats fortgesetzt, was erst in mehreren Stunden erreichbar ist, so läßt sich der Rückstand nicht mehr aktivieren. Trotzdem aber bedarf der Rückstand in Gegenwart phosphatfreien Coferments einer Zugabe von anorganischem Phosphat, um wirksam zu sein. Die in dem Extrakt noch vorhandene Menge Phosphat reicht nicht mehr zur Entfesselung der Milchsäurebildung aus. Auch sonst läßt

sich beobachten, daß die Vermehrung des anorganischen Phosphats eine um so größere Wirkung auf das Ferment hat, je geschädigter es ist. Während die Vermehrung der Phosphatkonzentration in frischem Extrakt zunächst die Milchsäurebildung unbeeinflußt läßt oder sogar verringert, führt der Zusatz des Phosphats zu älterem Extrakt eine starke Steigerung herbei. In dialysiertem Extrakt wird teils durch die Dialyse, teils durch die Verdünnung der Gesamtgehalt des Phosphats in 1 ccm auf etwa 0,1 bis 0,15 mg P_2O_5 herabgesetzt, während er im unverdünnten Muskelextrakt 0,5 bis 0,6 mg P_2O_5 beträgt. Bei steigendem Zusatz von Phosphat zwischen 0,12 bis 0,6 mg P_2O_5 steigt die Milchsäurebildung des dialysierten, mit gereinigtem Coferment versetzten Extrakts an. Weniger empfindlich gegen Dialyse war der Muskelextrakt frisch gefangener Herbstfrösche. Bei diesen ließen sich während 80 bis 90 Minuten etwa zwei Drittel des Phosphats aus dem Rückstand entfernen, so daß der Gesamtgehalt in 1 ccm nur noch etwa 0,08 mg P_2O_5 betrug. Die Aktivierung durch Coferment und Phosphat verlief hier ähnlich. Mehrere derartige Versuche sind in der Tabelle I vereinigt. In einigen anderen Fällen war das Ergebnis negativ, indem entweder durch zu lange Dialyse der Fermentrückstand nicht mehr aktivierbar war oder die gereinigte Cofermentlösung zu wenig Coferment enthielt, oder schließlich auch die Dialyse zur Entfernung des Coferments nicht ausreichte. Diese Versuche sind fortgelassen, da es sich um technische Mängel handelt, die durch zunehmende Erfahrung zu vermeiden sind. Zu allen Versuchen wurden 0,3 ccm Rückstand, 0,02 n $NaHCO_3$ und 0,5 Proz. Stärke zugegeben und das Volumen mit KCl auf 0,9 ccm aufgefüllt. Versuchstemperatur 20^0. Die gereinigte Cofermentlösung war gegenüber den Ausgangssäften doppelt bis dreifach konzentriert.

Daß im Gegensatz zur Spaltung der Polysaccharide die Spaltung des Hexosephosphats in Milchsäure und Phosphat der Mitwirkung des Coferments nicht bedarf, ließ sich vermittelst wiederholter Extraktion der Muskulatur zeigen[1]), da die späteren Extrakte zwar das Milchsäure bildende Ferment in hoher Konzentration, aber fast kein Coferment mehr enthalten. Vermittelst Dialyse und einem von Glykogen befreiten Coferment läßt sich dies Ergebnis bestätigen (Vers. 10). Das Coferment wurde hier aus Muskelkochsaft, nach Entfernung des Glykogens mit 50proz. Alkohol, vermittelst Ausfällung in 90proz. Alkohol gewonnen. Der Niederschlag wird abgenutscht, in absolutem Alkohol gewaschen und in m/10 Phosphatlösung gelöst. Die Entfernung des Coferments aus dem Extraktrückstand wird durch das Verhalten des Glykogens (a bis c) gezeigt.

---

[1]) *O. Meyerhof*, diese Zeitschr. **178**, 462, 1926.

Tabelle I.

Aktivierung des dialysierten Milchsäure bildenden Ferments durch gereinigtes Coferment und Phosphat.

Nr.	Datum	Dialysezeit	Cofermentzusatz (je 0,4 ccm)	Zusatz m/15 Phosphat ccm	Gesamtphosphatgehalt mg P_2O_5	Dauer des Glykolyseversuchs	CO_2 cmm
4	4. V.	40′	—	—	nicht bestimmt	30′	**1**
		40	Muskelkochsaft	—	„ „	30	**24**
		40	gerein. Filtrat	—	„ „	30	**1**
		40	„	0,05	„	30	**18**
5	6. V.	40	—	—	„ „	30	**8**
		40	Muskelkochsaft	—	„ „	30	**46**
		40	gerein. Filtrat	—	„ „	30	**8,5**
		40	„	0,05	„ „	30	**28**
6	14. V.	40	—	—	„ „	45	**2**
		40	Kochsaft	—	„ „	45	**40**
		40	gerein. Filtrat	—	0,11	45	**0**
		40	„	0,025	0,23	45	**8,5**
		40	„	0,05	0,35	45	**14,5**
		40	„	0,10	0,60	45	**22,5**
7	20. V.	40	—	—	nicht bestimmt	60	**8**
		120	Kochsaft	—	„ „	60	**110**
		40	gerein. Filtrat	—	0,16	60	**10**
		40	„	0,025	0,28	60	**28**
		40	„	0,05	0,41	60	**49**
		40	„	0,10	0,66	60	**46**
8	7. X.	90	—	—	0,05	90	**12**
		90	Kochsaft	0,05	0,82	90	**88**
		90	gerein. Filtrat	—	0,085	90	**10,5**
		90	„	0,05	0,34	90	**46**
9	9. X.	80	—	—	0,08	2	**4,0**
		80	Kochsaft	—	2,40	2	**81,5**
		80	gerein. Filtrat	—	0,11	2	**5,0**
		80	„	0,05	0,36	2	**28**

Versuch 10. 28. Juli 1926. Extrakt 60 Minuten dialysiert. Je 1 ccm Gesamtflüssigkeit mit 0,3 ccm Extraktrückstand, 0,4 Proz. Glykogen oder hexosephosphorsaurem Mg 0,02 mol. $NaHCO_3$, in 2 Stunden:

	CO_2 cmm
a) Mit 0,5 ccm KCl, 0,4 Proz. Glykogen	2
b) „ 0,5 „ Muskelkochsaft, 0,4 Proz. Glykogen	67,5
c) „ 0,5 „ Cofermentlösung, 0,4 Proz. Glykogen	36
d) „ 0,5 „ KCl, 0,4 Proz. Hexosephosphat	24
e) „ 0,5 „ Cofermentlösung, 0,4 Proz. Hexosephosphat . . .	14,5

II. Ist das Coferment der Milchsäurebildung auch ein Coferment der Atmung?

Nachdem festgestellt ist, daß das Coferment der Milchsäurebildung genau die gleiche Funktion hat wie das Coferment der alkoholischen

Gärung der Hefe[1]) und der wechselseitige Ersatz der beiden Coenzyme[2]) für ihre Identität spricht, erhebt sich die Frage, ob der früher als „Atmungskörper" bezeichnete Substanzkomplex ein Coferment der Atmung enthält, das mit dem der Milchsäurebildung identisch ist. Es war gezeigt worden, daß dieser Atmungskörper, der zum Teil dem „Pnein" von *Battelli* und *Stern*[3]) entspricht, in der gleichen Weise inaktiviert, gefällt, konzentriert werden kann, wie das Coferment der alkoholischen Gärung im Muskel, und daraus gefolgert, daß hier ein Coferment der Atmung vorliegt, das mit dem der Gärung identisch zu sein scheint[4]). Dem widerspricht es nicht, daß, wie insbesondere von *Hopkins* und seinen Schülern[5]) hervorgehoben wird, der als „Atmungskörper" bezeichnete Substanzkomplex auch Nährsubstanzen enthält, die bei der Atmung oxydiert werden. Das Vorhandensein eines Coferments der Atmung würde sichergestellt sein, wenn es in ähnlicher Weise wie bei der Gärung gelänge, dieses von allen Nährstoffkomponenten zu befreien und eine Fraktion zu erhalten, die, zusammen mit dem Muskelrückstand unwirksam, diesen erst bei weiterem Zusatz oxydabler Substanzen zur Atmung befähigte. Dies läßt sich jedoch leider nicht durchführen. Der Muskel*extrakt* ist ungeeignet, weil er selbst keine Sauerstoffaufnahme zeigt. Die zerschnittene Muskulatur läßt sich zwar annähernd von Kohlehydrat und Milchsäure befreien, aber die Möglichkeit, daß Eiweiß oxydiert werden kann, läßt sich nicht ausschließen, und das Eiweiß ist natürlich aus dem Muskelrückstand nicht zu entfernen. Wenn auch im glykogenhaltigen Kaltblütermuskel die Oxydation von Kohlehydrat weit überwiegt, so ist doch in Analogie zu den Befunden am Zwerchfell hungernder Ratten[6]) anzunehmen, daß nach Entfernung aller Kohlehydrate der Muskel Eiweiß, vielleicht auch Fett oxydieren kann, die in dem gewaschenen fermenthaltigen Muskelrückstand zurückbleiben. In diesem Falle muß aber auch die Zugabe gereinigten Coferments zum Muskelrückstand eine Oxydation hervorrufen, und dies war auch das Ergebnis meiner dahingehenden Versuche. Wird der Muskelrückstand und der Atmungskörper von Glykogen, Zucker, Hexosediphosphorsäure und Milchsäure größtenteils befreit, so ist die durch den gereinigten „Atmungskörper" reaktivierbare Atmung an sich

---

[1]) *O. Meyerhof*, Naturw. **14**, 1175, 1926.

[2]) *Derselbe*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **101**, 165, 1918; **102**, 1, 1918; diese Zeitschr. **178**, 395, 1926.

[3]) Zusammenfassung: Abderhaldens Handb. d. Biochem. Arbeitsmethod.

[4]) *O. Meyerhof*, Hoppe-Seylers Zeitschr. f. phys. Chem. **102**, 1, 1918.

[5]) *Holden*, Biochem. Journ. **17**, 361, 1923; **18**, 535, 1924.

[6]) *Meyerhof*, *Lohmann*, *Meier*, diese Zeitschr. **157**, 459, 1925; *Takane*, ebendaselbst **171**, 403, 1926.

erheblich kleiner geworden, aber sie wird auch ohne weiteren Zusatz von Nährsubstraten beobachtet. Durch Zusatz von Glykogen und Milchsäure wird diese Oxydation allerdings gesteigert. In der Regel ist der respiratorische Quotient dieser reaktivierten Atmung verkleinert, was dafür spricht, daß sie nicht auf den zurückgebliebenen Rest an Glykogen, sondern eher auf die Oxydation von Eiweiß zu beziehen ist.

Da die Milchsäurebildung im Muskel die Geschwindigkeit der Atmung bestimmt[1]), so könnte man zwar den bisherigen Beobachtungen die Deutung geben, daß das scheinbare Coferment der Atmung in Wirklichkeit nur eins der Milchsäurebildung ist. Wahrscheinlicher jedoch bleibt es, daß es sich als wirkliches Coferment der Atmung ebenso wie bei der Gärung und der Milchsäurebildung in der Veresterung der Phosphorsäure betätigt, durch die die organischen Moleküle in zerfallsbereite Form umgelagert werden[2]). Die Atmungsaktivierung von kohlehydratarmem Muskelrückstand durch gereinigten Atmungskörper ergibt sich aus den beiden folgenden Versuchsbeispielen:

Versuch 11. 15. Juli 1926. Befreiung des Atmungskörpers von Hexosephosphorsäure, Glykogen, Milchsäure:

36 g Muskel + 46 ccm 3proz. $NaHCO_3$ 2 Stunden bei 38° gehalten (Spaltung des Lactacidogens), mit Essigsäure neutralisiert, aufgekocht. 50 ccm Kochsaft + 50 ccm 96proz. Alkohol: Glykogenfällung abzentrifugiert, auf 26 ccm eingeengt + 234 ccm absoluten Alkohols. Die Alkoholfällung mit absolutem Alkohol gewaschen, in 10 ccm Wasser suspendiert. Die Suspension des Niederschlags ist völlig frei von Milchsäure (Veratrolprobe nach *Mendel* und *Goldscheider*[3])].

Je 0,3 g gewaschener Muskelrückstand (Ausgangsgewicht) auf 2,0 ccm aufgefüllt mit Phosphat und Zusätzen.

	O_2 in 4 Stdn. cmm
1. 0,3 g ungewaschene Muskulatur	183
2. 0,3 g gewaschene „ ohne Zusatz	1
3. 0,3 g „ „ + 0,8 ccm gereinigtes Coferment	56,7
4. 0,3 g „ „ + 0,8 „ „ „ + 0,1 m/2 Natriumlactat	67,4
5. 0,3 g gewaschene Muskulatur + 0,1 m/2 Natriumlactat + Wasser	15,9

In dem folgenden Versuch 12 wurde auch das Glykogen aus dem Muskelrückstand nach Möglichkeit entfernt, indem die Muskulatur vor dem Auswaschen in m/10 Natriumphosphat suspendiert und

[1]) *Meyerhof, Lohmann, Meier,* a. a. O., S. 463, 1926.

[2]) Siehe hierzu auch *Euler* und *Nilsson,* Zeitschr. f. physiol. Chem. **160,** 234, 1926.

[3]) Diese Zeitschr. **164,** 163, 1925.

20 Stunden bei Zimmertemperatur in Stickstoff gehalten wurde, um das Glykogen in Milchsäure zu spalten.

Versuch 12. 26. Juli 1926. 3 g Muskulatur enthalten vor der Anaerobiose 14 mg Glykogen (als Glucose berechnet), nachher 2 mg.

Je 0,5 g glykogenarme Muskulatur geben in 2 ccm Flüssigkeit in 2 Stunden:

	O_2 cmm
1. Ungewaschene Muskulatur	65,2
2. Gewaschen ohne Zusatz	0
3. „ mit 0,8 ccm Kochsaft	59
4. „ „ 0,8 „ gereinigtem Coferment (Herstellung wie im vorigen Versuch)	17
5. Gewaschen mit 0,8 ccm gereinigtem Coferment + 0,15 ccm 6 proz. Glykogen	22
6. Gewaschen mit 0,8 ccm gereinigtem Coferment + 0,1 ccm m/2 Natriumlactat	25

In diesem Versuch ist durch die Vorbehandlung der Muskulatur zur Entfernung des Glykogens die Atmung bereits stark geschädigt.

Unter den gleichen Umständen ergaben sich die in der Tabelle II zusammengestellten respiratorischen Quotienten[1]).

Tabelle II.

Respiratorischer Quotient der reaktivierten Atmung durch Muskelkochsaft und gereinigtes Coferment.

Nr.	Datum	Vorbehandlung der Muskulatur	Zusätze	Gewicht	Zeit in Stdn.	O_2 cmm	CO_2 cmm	R.Q.
1	17. IX.	frisch	—	0.3	3	205	207	1,01
2	20. IX.	„	—	0,3	3	246	240,4	0,98
3	21. IX.	„	—	0,3	3	281	270,8	0,965
4	21. IX.	gewaschen	Kochsaft	0,3	3	130	86	0,66
4a	21. IX.	„	gerein. Coferment	0,3	3	141	123	0,88
5	24. IX.	„	Kochsaft	0,3	3	171	146	0,85
5a	24. IX.	„	gerein. Coferment	0,3		277	246	0,89
6	25. IX.	glykogenarm gemacht, gewaschen	Kochsaft	0,5		57	43,5	0,76
6a	25. IX.	glykogenarm gemacht, gewaschen	gereinigtes Coferment	0,5	2	73,5	34,4	0,47
7	27. IX.	glykogenarm gemacht, gewaschen	gereinigtes Coferment	0,5	2	106	82	0,87
8	28. IX.	glykogenarm gemacht, gewaschen	Kochsaft	0,5	2	67	62,7	0,935
8a	28. IX.	glykogenarm gemacht, gewaschen	gereinigtes Coferment		2	36,7	28,2	0,77

[1]) Methode wie bei *O. Meyerhof*, Pflügers Arch. **175**, **34**, **1919**.

III. Über den Mechanismus der Fluorid- und Oxalathemmung.

Die Untersuchung der chemischen Bestandteile des Milchsäure bildenden Ferments führte zu der Frage, ob an seiner Wirkung Calciumionen beteiligt seien. Diese Möglichkeit war durch die spezifische Hemmung der Milchsäurebildung mittels Oxalat und Fluorid nahegelegt. Die Froschmuskeln enthalten nach *Urano*[1]) durchschnittlich 0,01 Proz. Calcium, was nach 20- bis 42stündiger Dialyse kaum abnahm.

In 10 ccm des auf die gewöhnliche Weise hergestellten Muskelextrakts fand ich nach trockener Veraschung und Calciummikrobestimmung [Methode *Cramer-Tisdall*[2])] in verschiedenen Versuchen 0,116, 0,124, 0,156, 0,114 mg Ca. Dieser Gehalt änderte sich bei ein- bis vierstündiger Dialyse nicht merklich, z. B. fanden sich direkt 0,142 mg Ca, nach 2 1/4 stündiger Dialyse 0,140 mg Ca; in einem anderen Versuch in frischem Extrakt 0,114 mg, nach 2 Stunden 0,134 mg, nach 8 Stunden 0,084 mg. Daraus geht hervor, daß das Calcium, wenn auch nicht ganz undialysabel, jedenfalls nicht dem dialysablen Coferment angehören kann. Weiter aber zeigt sich, daß durch Oxalat- und Fluoridkonzentrationen, die bereits die Milchsäurebildung völlig hemmen, das im Extrakt vorhandene Calcium bei neutraler Reaktion nicht ausgefällt wird, so daß, auch wenn es zum größten Teil ionisiert sein sollte, das Löslichkeitsprodukt der Salze noch nicht überschritten ist. Wurde der Calciumgehalt der Extraktlösung und des sich spontan abscheidenden Bodensatzes, besonders bei Dialyse mit destilliertem Wasser, getrennt bestimmt, so wurde durch die Gegenwart von Fluorid und Oxalat in der Volumeneinheit der unteren Flüssigkeitsschicht einschließlich Niederschlag der Calciumgehalt nicht erhöht. Der Niederschlag schließt aber schon spontan einen verhältnismäßig hohen Calciumgehalt ein. So fanden sich z. B. nach 30 Minuten langer Dialyse in je 13,3 ccm Extrakt:

Versuch 13. 6. Juli 1926.

	10 ccm überstehende Lösung	3 ccm untere Schicht einschl. Bodensatz
Ohne Zusatz	0,069 mg Ca	0,065 mg Ca
Mit n/1000 Na_2-Oxalat	0,083 „ „	0,040 „ „
Mit n/1000 NaF . .	0,069 „ „	0,044 „ „

Danach erscheint es unwahrscheinlich, daß die Wirkung von Fluorid und Oxalat auf Entionisierung von Ca beruht.

---

[1]) Zeitschr. f. Biol. 50, 212, 1908.
[2]) Journ. of biol. Chem. 47, 475, 1921.

Daß durch sehr kleine Fluorid- und Oxalatkonzentrationen der Lösungszustand der Proteine beeinflußt wird, läßt sich in manchen Anordnungen erkennen. Häufig trüben sich z. B. bei der Dialyse die Fluorid und Oxalat enthaltenden Lösungen rascher als ohne Zusatz. Doch ist es schwierig, das Phänomen reproduzierbar zu gestalten, da der Extrakt mehrere leicht ausflockende Eiweißfraktionen enthält, die sich gegenüber Salzen verschieden verhalten. Für eine kolloidchemische Deutung der Fluorid- und Oxalathemmung spricht, daß sie von Milieubedingungen abhängig sind. Durch Vermehrung des Phosphatgehalts der Extrakte werden die Hemmungen stark abgeschwächt. Andererseits werden sie durch Vermehrung des Eiweißgehalts — Zugabe von inaktiviertem Extrakt — deutlich erhöht. Dies ergibt sich aus den folgenden Beispielen. [Die angeführten Zahlen Kubikmillimeter Kohlensäure = 0,004 mg Milchsäure sind für Retention und Phosphatveresterung korrigiert[1])].

Tabelle III.

Abhängigkeit der Fluorid- und Oxalathemmung von Milieubedingungen. Je 0,4 ccm Extrakt auf 1 ccm aufgefüllt, 0,4 Proz. Stärke, 0,03 mol. $NaHCO_3$.

Nr.	Datum 1926	Zusatz zum Extrakt	Konzentration Ox. und Fl.	CO_2 in 1 Std. cmm	Hemmung Proz.
1	1. XI.	0	—	161	—
		0	0,025 mol. Ox.	14,7	91
		0	0,0025 „ „	39,0	76
		0,05 ccm m/15 Phosphat	—	99	—
			0,025 „ „	39,5	60
			0,0025 „ „	97	2
		0,25 ccm inaktivierter Extrakt	—	152	—
			0,025 „ „	8,8	94
			0,0025 „ „	8,8	94
2	26. X.	0	—	154,7	—
		0	0,012 „ Fl.	1	100
		0	0,0012 „ „	92,6	40
		0,05 ccm m/15 Phosphat	—	76	—
			0,012 „ „	49	36
			0,0012 „ „	76,5	0
		0,25 ccm inaktivierter Extrakt	—	194	—
			0,012 „ „	0	100
			0,0012 „ „	47	76

[1]) Vgl. *O. Meyerhof*, diese Zeitschr. **178**, 462, 1926.

IV. Versuche zur Ausfällung und Reinigung des Ferments.

Daß das glykolytische Ferment durch Aceton in ähnlicher Weise wie die Zymase niedergeschlagen werden kann, ist von *O. Meyerhof*[1]) gezeigt worden. Ich habe Versuche ausgeführt, um eine stärker differenzierende Fällung zu erhalten, vor allem durch fraktionierte Fällung von Eiweiß. Vorversuche ergaben, daß solche Eiweißfällungsmittel, die grob fällen und das Eiweiß leicht denaturieren, das Ferment zerstören, z. B. Essigsäure, halbgesättigtes Ammonsulfat usw. Positive Resultate ließen sich dagegen erzielen 1. durch Fällung mit Kohlensäure, 2. durch Fällung mit einem Acetatgemisch von p_H 4,4. Diese letztere Methode, die sich genauer abstufen ließ, war erheblich günstiger und ließ sich in Kombination mit der Salzfällung zu einer fortschreitenden Reinigung und Konzentrierung des Ferments — bezogen auf den Eiweißgehalt — benutzen.

1. Die Fällung mit Kohlensäure im Extrakt von Frosch- und Kaninchenmuskulatur wurde bei — 1 bis — 2° vorgenommen. Es wurde so lange Kohlensäure eingeleitet, bis der Extrakt stark getrübt war. Die Trübung wurde auf einer rasch laufenden Zentrifuge, 5000 Touren in der Minute, Tangentialgeschwindigkeit = 5200 m/Min., scharf abzentrifugiert, mit kohlensäuregesättigtem Wasser gespült und der Bodensatz dann in verdünnter Phosphatlösung suspendiert, wobei er zum Teil in Lösung ging. Je ein Versuch mit Froschmuskel- und Kaninchenmuskelextrakt ist im folgenden wiedergegeben.

Versuch 14. 21. Oktober 1926. 18 ccm Froschmuskelextrakt in destilliertem Wasser, 5 Minuten lang Kohlensäure durchgeleitet, dann scharf zentrifugiert, Bodensatz zweimal mit kohlensäuregesättigter KCl-Lösung nachgespült, in 5 ccm m/7,5 Phosphat suspendiert. Die nach der Fällung erhaltene Restlösung wird unverändert benutzt. Je 1 ccm Flüssigkeit mit 0,02 mol. $NaHCO_3$ in KCl in 90 Minuten.

	CO_2 (ohne Retentionsbestimmung) cmm
1. 0,3 ccm Ausgangsextrakt + 0,4 Proz. Stärke	118,5
2. 0,3 „ Fällung + 0,4 ccm KCl + 0,4 Proz. Stärke	1,5
3. 0,3 „ „ + 0,4 „ Muskelkochsaft + 0,4 Proz. Stärke .	19
4. 0,3 „ Restlösung + 0,4 ccm KCl + 0,4 Proz. Stärke	35
5. 0,3 „ Fällung + 0,4 ccm KCl + 0,4 Proz. Mg-Hexosephosphat .	18,5
6. 0,3 „ Restlösung + 0,4 ccm KCl + 0,4 Proz. Mg-Hexosephosphat	53

[1]) Diese Zeitschr. **178**, 395, 1926.

Aus Versuch 14 sieht man, daß der Niederschlag nur das Ferment, aber nicht das Coferment enthält, da zwar die Hexosephosphatspaltung mit ihm direkt möglich ist, dagegen die Stärkespaltung nur unter Zusatz von Kochsaft. Daß das Coferment nicht mit gefällt wird, ist naheliegend, da es ja auch beim Kochen des Extrakts in Lösung bleibt.

Versuch 15. 6. November 1926. Je 6 ccm Kaliumchloridextrakt und d. W.-Extrakt von Kaninchenmuskulatur mit Kohlensäure gesättigt. Trübung auf rascher Zentrifuge abzentrifugiert. Je einmal mit 5 ccm Kohlensäure gesättigtem Wasser gewaschen, in 0,8 ccm Lösung suspendiert. Mit 0,04 mol. $NaHCO_3$ und 0,4 Proz. Glykogen erhalten:

	CO_2 (ohne Retentionsbestimmung) cmm
1. 90' 0,5 ccm d. W.-Extrakt (Ausgangslösung)	148,5
2. 90' 0,4 „ CO_2-Fällung + 0,3 ccm Kochsaft	34,5
3. 60' 0,5 „ KCl-Extrakt (Ausgangslösung)	137
4. 90' 0,4 „ Kohlensäurefällung d. KCl-Extrakts + 0,3 ccm Kochsaft	37,5

Berücksichtigt man, daß in beiden Versuchen ein verhältnismäßig großer aliquoter Teil des Niederschlags benutzt ist (im ersten Falle das 3½fache, im zweiten das 6fache des Ausgangsextrakts von Nr. 1), während die Wirksamkeit nur 16 und 24 Proz. der Ausgangslösung beträgt, so ist das Ergebnis der Fällungen nicht sehr befriedigend. Andererseits fällt aber auch mit Kohlensäure nur ein sehr geringer Teil des vorhandenen Eiweißes aus. Doch wurde auf die Ausarbeitung dieser Methode verzichtet, weil die Fällung mit saurem Acetat viel bessere Resultate ergab.

2. Fällung mit saurem Acetat. Die Resultate mit Froschmuskelextrakt und Kaninchenmuskelextrakt verliefen im großen und ganzen ähnlich, doch ergab der erstere übersichtlichere Resultate. Stets wurde in den erhaltenen Fraktionen die Milchsäurebildung (manometrisch mit Veresterungskorrektur), die Phosphatveresterung (kolorimetrisch), der Eiweißgehalt (Mikrokjeldahl nach *Michaelis*) bestimmt. Berechnet wurde für den Ausgangsextrakt sowohl die Wirksamkeit bezogen auf 1 g Muskulatur[1] (w), wie auch bezogen auf mg Trockengewicht (u), bzw. mg Eiweiß (u') (1 mg N = 6 mg Eiweiß), in den wirksamen Fraktionen des Ferments allein die letztere Größe.

Im folgenden sind eine Reihe solcher Versuche mit dem Trennungsgang wiedergegeben, in denen eine weitgehende Konzentrierung ge-

[1]) Siehe *O. Meyerhof*, diese Zeitschr. **178**, 395, 1926.

lang. Hierbei ist auch stets der Gesamtzuckerumsatz, bestehend aus Veresterung + Milchsäurebildung, berücksichtigt (= u'', bezogen auf mg Eiweißgehalt). Es ergibt sich die auffällige Tatsache, daß in den gereinigten Fermentlösungen die Esteranhäufung sehr erheblich ist, ja daß ähnlich wie sonst unter Fluoridwirkung eventuell der reagierende Zucker nur noch verestert, der Ester aber nicht wieder aufgespalten wird. Man muß dies entweder so deuten, daß das veresternde Enzym in höherer Konzentration als das spaltende abgeschieden wird, oder wahrscheinlicher, daß die Spaltung aus irgendwelchen Gründen gehemmt ist. Ein zweiter Unterschied gegenüber dem unveränderten Extrakt besteht darin, daß die Spaltungsgeschwindigkeit nicht wie hier zunächst sehr hoch ist und dann nach etwa 20 bis 30 Minuten auf ein langsam abfallendes Niveau sinkt, sondern daß sie umgekehrt langsam steigt, was man in frischem Extrakt nur bei sehr hohem Phosphatgehalt beobachtet. Die für weitere Reinigung günstigste Verschiebung der Eigenschaften besteht aber darin, daß die Haltbarkeit des Ferments mit Verringerung des Eiweißgehalts zunimmt. Während der genuine Extrakt aus Froschmuskulatur bei 12stündigem Stehen auf Eis seine Wirksamkeit völlig verliert, zeigen die gereinigten Lösungen nach 24 Stunden noch gut die halbe, nach 48 Stunden etwa ein Viertel der ursprünglichen Aktivität, eventuell auch noch höhere. Alle Prozeduren wurden in den stark abgekühlten Lösungen bei etwa -2^0 vorgenommen. Das Zentrifugieren war so kurz wie möglich, und bis zum Meßbeginn wurden alle Fraktionen kalt gehalten.

Auch hier ist es selbstverständlich, daß nur das Ferment, aber nicht das Coferment ausgefällt wird, und daß daher für die Polysaccharidspaltung Muskelkochsaft hinzugegeben werden muß. Da die Spaltung des Hexosephosphats ohne Coferment geschieht, bedarf es hierfür des Kochsaftes nicht, indessen ist, wie schon erwähnt, die Aufspaltung des Hexosephosphats im Vergleich zu der Veresterung des Glykogens verhältnismäßig gering.

Für die Wirksamkeit, bezogen auf den Eiweißgehalt, den man annähernd dem organischen Trockengewicht des Extrakts gleichsetzen kann, mag als Orientierung dienen, daß im Muskelbrei bei 20^0 pro 1 g feuchter Muskel = 200 mg Trockengewicht etwa 3 mg Milchsäure pro Stunde gebildet werden. Es ergibt sich eine Umsatzgröße (u) von 0,015 mg Milchsäure pro 1 mg. Der genuine Extrakt von Frosch- oder Kaninchenmuskulatur zeigt eine mittlere Wirksamkeit w pro Gramm Muskel von 2,0 mg, was einem u von etwa 0,03, bzw., auf den Eiweißgehalt bezogen, einem u' von 0,04 mg entspricht. (Bei Kaninchenmuskelextrakt fällt die Geschwindigkeit oft nach einer Stunde recht steil ab.) Demgegenüber

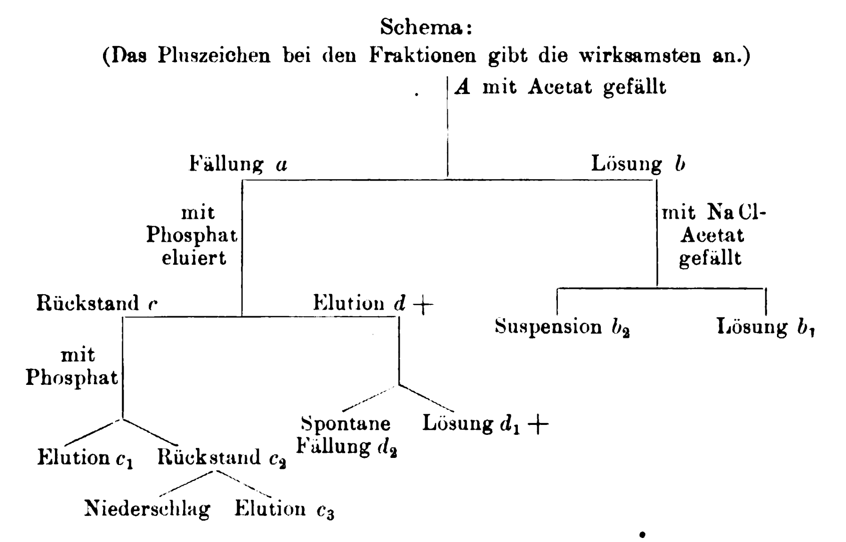
ist der Wert für die bestgereinigten Lösungen, bezogen auf den Zuckergesamtumsatz, 0,7 bis 0,9 mg (u''), für die Milchsäurebildung 0,26 mg (u'). Es ist also bezüglich des Gesamtumsatzes eine etwa 20fache, bezüglich der Milchsäurebildung eine achtfache Konzentrierung eingetreten.

Das Prinzip der Trennungsmethode bestand darin, durch Zugabe von saurem Acetat (p_H 4,4) eine durchschnittliche H-Ionenkonzentration von etwa p_H 5 herzustellen, wodurch ein Teil des Eiweißes ausflockt. Hierbei gelangt ein mehr oder minder großer Teil des Ferments in den Niederschlag *a*, der abzentrifugiert wird. In Extrakten von Froschmuskulatur gelingt es, hierbei das ganze Ferment mitzureißen, so daß die abzentrifugierte Lösung *b* sich nicht nur nach Neutralisierung selbst unwirksam erweist, sondern auch durch neue Fällung keine wirksamen Fraktionen mehr liefert. Wird nun der abzentrifugierte Niederschlag *a* in schwach alkalischer Phosphatlösung suspendiert, so geht ein Teil in Lösung. Diese Elution *d* enthält das Ferment, der sich nicht wieder auflösende Niederschlag *c* ist unwirksam. Auch hier erhält man, wenn man ihn in Acetatlösung wäscht und von neuem in schwach alkalischer Phosphatlösung eluiert, keine nachweisliche Fermentmenge. Läßt man die Elution *d* stehen, so flockt ein Teil des Eiweißes aus, wodurch die zurückgebliebene Lösung d_1 bei geringerem Eiweißgehalt dieselbe oder sogar eine höhere Wirksamkeit besitzt. Diese Elution *d* läßt sich noch einmal mit Acetat fällen und wieder eluieren. Die Elution *e* ist in diesem Falle noch erheblich konzentrierter an Ferment, bezogen auf den Eiweißgehalt. Die Elution d_1 der beiden Versuche mit Froschmuskelextrakt wurde auch nach 24- und 48stündigem Stehen auf Eis geprüft und hatte dadurch nur einen Teil ihrer Wirksamkeit eingebüßt, während der Ausgangsextrakt selbst völlig unwirksam geworden war.

Etwas unübersichtlicher verliefen die Versuche mit Kaninchenmuskelextrakt, da hier durch Fällung mit saurem Acetat ein großer Teil des Ferments in Lösung bleibt, dann aber durch weitere Zugabe von Acetat und festem Salz (NaCl oder KCl) eine Fällung entsteht, die die Hauptmenge des Ferments enthält. Diese Fällung kann durch alkalische Phosphatlösung ähnlich eluiert werden wie die Fällung *a* im Froschmuskelextrakt, und ein unwirksamer Niederschlag bleibt zurück. Die Umsatzgröße, bezogen auf den Eiweißgehalt, ist hier ähnlich groß wie bei diesem. Doch enthält auch die erste Fällung *a* einen Teil des Ferments und kann weiter gereinigt werden. Im folgenden sind zwei Versuche mit Froschmuskel- und zwei besser verlaufene mit Kaninchenmuskelextrakt wiedergegeben.

Versuch 16. 4. Dezember 1926. Froschmuskelextrakt.

Schema:
(Das Pluszeichen bei den Fraktionen gibt die wirksamsten an.)



13,5 ccm Ausgangsextrakt mit destilliertem Wasser (A) + 11 ccm destilliertes Wasser + 3 ccm 0,15 mol. Acetat (p_H 4,4). Abzentrifugierte Fällung a + 5 ccm destilliertes Wasser + 2 ccm n/50 NaOH + 2 ccm m/15 Phosphat eluiert (d). Rückstand etwa mit 5 ccm Wasser und 2 ccm 0,15 mol. Acetat gewaschen. Mit verdünnter Natronlauge auf 10 ccm neutralisiert: Elution c_1. Rückstand c_2 in 7 ccm destillierten Wasser und 1 ccm m/15 Phosphat eluiert, Elution c_3.

Elution d nach dreistündigem Stehen im Kältegemisch spontan geflockt, spontane Fällung d_2 abzentrifugiert und in 5 ccm Wasser + 0,5 ccm m/15 Phosphat suspendiert. Lösung d_1 zurückbleibend.

Lösung b des ersten Niederschlags, 18 ccm mit 1,8 g festem Natriumchlorid + 2 ccm m/6 Acetat (p_H 4,4) versetzt; Trübung abzentrifugiert, Lösung neutralisiert: b_1; Bodensatz in 8 ccm Wasser + 0,75 m/15 Phosphat: b_2.

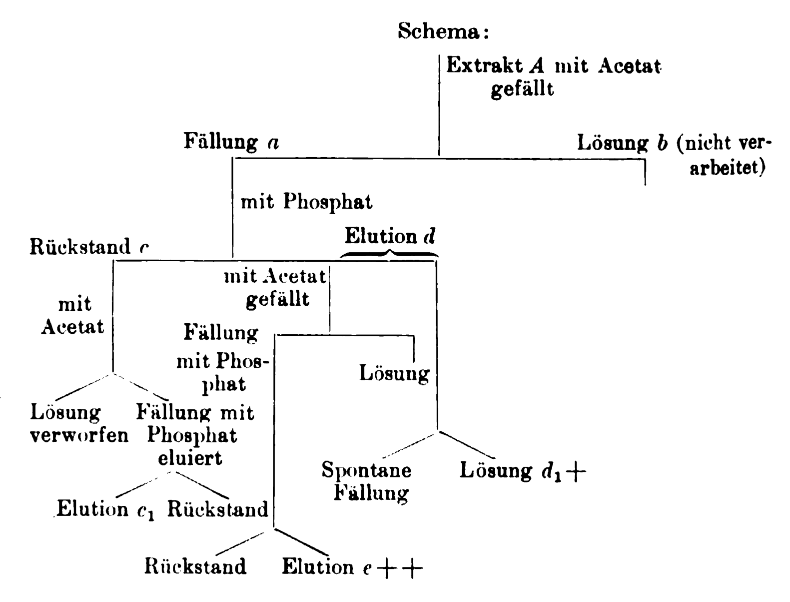
Die Wirksamkeit der einzelnen Fraktionen ergibt sich aus der folgenden Übersicht, in der aus der Messungszeit von 2½ Stunden der durchschnittliche Umsatz pro 1 Stunde für je 0,5 ccm der bezeichneten Fraktion berechnet ist. Die manometrisch bestimmte Milchsäure ist für Retention und Phosphatveresterung korrigiert. Temperatur 20°, Flüssigkeitsmenge 1 ccm, enthält 0,4 Proz. Stärke und 0,04 mol. $NaHCO_3$, 0,3 ccm Kochsaft.

Die Wirksamkeit w des Ausgangsextrakts ist 2,42, also relativ hoch. Die Konzentrierung des Ferments bezüglich des Gesamtumsatzes wie der Milchsäurebildung betrug knapp das Vierfache.

Nr.	Bezeichnung der Fraktion	Milchsäure mg	Zuckerveresterung mg	Gesamtumsatz Zucker pro Stunde mg	Eiweiß in 0,5 ccm mg	u'' Gesamtumsatz pro mg Eiweiß mg	u' Milchsäureumsatz pro mg Eiweiß mg
1	A	0,419	0,136	0,555	10,7	**0,052**	**0,039**
2	d	0,218	0,254	0,472	3,54	**0,183**	**0,062**
3	d_1	0,460	0,074	0,534	3,09	**0,178**	**0,150**
4	d_2	0,02	nicht bestimmt	—	—	—	—
5	c_1	0,010		—	—	—	—
6	c_2	0,010		—	—	—	—
7	b_1	0,019		—	—	—	—
8	b_2	0,016		—	—	—	—

Die Fraktion d_1 wurde nach 24- und 48stündigem Stehen auf Eis geprüft. Die Milchsäurebildung, unter gleichen Verhältnissen wie in der Tabelle, betrug im Durchschnitt von 2 Stunden stündlich nach eintägigem Stehen 0,26 mg, nach zweitägigem Stehen 0,10 mg, statt bei der direkten Messung 0,46 mg.

Versuch 17. 6. Dezember 1926. Forschmuskelextrakt.



Der Versuch wurde zunächst als Wiederholung des vorigen ausgeführt, aber die als unwirksam erkannten Fraktionen verworfen. Die erste Fällung, hergestellt durch Zusatz von 3 ccm 0,15 mol. Acetat (p_H 4,4) zu 8,5 ccm Extrakt + 20 ccm destilliertes Wasser besaß ein p_H von 5,3 (alle Messungen mit der Chinhydronelektrode). Die Elution *d*

in 16 ccm schwach alkalischem Phosphat, davon 8 ccm nach dreistündigem Stehen durch Zentrifugieren geklärt: d_1. Die andere Hälfte der Elution nochmals mit 1 ccm Acetat gefällt, Niederschlag mit alkalischem Phosphat eluiert auf 10 ccm: *e*.

Bei 20° in 2 Stunden ergeben sich die in der Übersicht angegebenen stündlichen Umsatzgrößen. Je 0,5 ccm Extrakt mit 0,3 ccm Kochsaft auf 1 ccm usw. wie im vorigen Versuch.

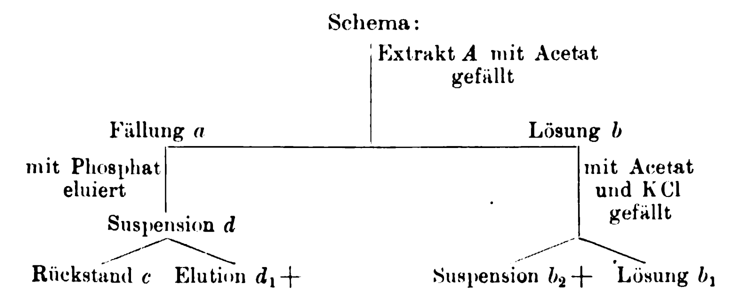
Nr.	Bezeichnung der Fraktion	Milchsäure mg	Zuckerveresterung mg	Gesamtumsatz Zucker pro Stunde mg	Eiweiß in 0,5 ccm mg	u'' Gesamtumsatz pro mg Eiweiß mg	u' Milchsäureumsatz pro mg Eiweiß mg
1	A	0,565	0,197	0,762	16,5	**0,046**	**0,034**
2	d_1	0,175	0,19	0,365	2,27	**0,161**	**0,077**
3	e	0,063	0,169	0,232	0,31	**0,787**	**0,200**
4	c_1	0,01	—	—	—	—	—

In diesem Falle war durch die zweite Fällung und Elution *e* die Konzentrierung des Ferments sehr viel größer. Der Gesamtumsatz pro Milligramm Eiweiß war auf etwa das 15fache, die Milchsäurebildung auf etwa das 6fache gestiegen. Dabei war die Ausgangswirksamkeit *w* des Extrakts schon sehr hoch, 3,25 mg. Nach 48stündigem Stehen betrug die stündliche Milchsäurebildung im Durchschnitt von 2 Stunden unter den gleichen Verhältnissen wie in der Tabelle bei *A* 0,02 mg, bei d_1 0,18 mg; während sie also im Extrakt *A* erloschen war, war sie in der letzteren Lösung überhaupt nicht merklich abgefallen.

Bei den folgenden Versuchen mit Kaninchenmuskelextrakt wird durch Zusatz von Acetatpuffer p_H 4,4 und einem p_H der Gesamtlösung von etwa 5,0 weniger Eiweiß ausgefällt. Infolgedessen wird nur ein Teil des Ferments mitgerissen. Der Hauptanteil, im zweiten der angegebenen Versuche nahezu die ganze Menge, bleibt in Lösung und kann durch weitere Zugabe von Acetat mit festem Alkalisalz niedergeschlagen werden.

Versuch 18. 26. November 1926. Kaninchenmuskelextrakt.

Schema:



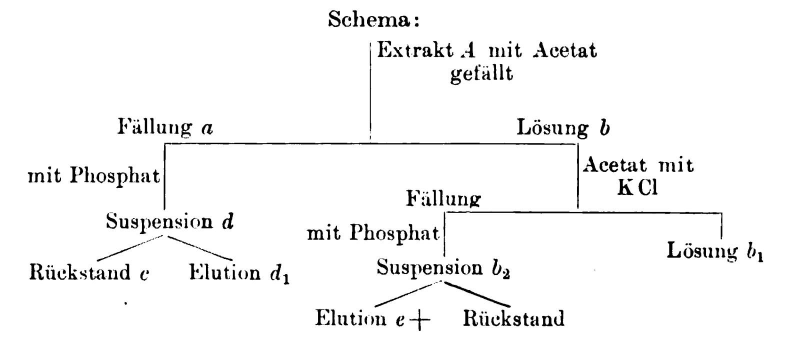
25 ccm Extrakt + 6 ccm 0,15 mol. Acetat, p_H 4,4. Fällung *a* abzentrifugiert, Niederschlag in 11 ccm NaOH + Phosphat suspendiert: *d*. Ein Teil von Ungelöstem durch Zentrifugieren befreit: d_1. Lösung *b* der ersten Fällung mit 2 ccm 0,15 mol. Acetat + 2,3 g festen KCl neu gefällt (p_H 4,86). Fällung in 7 ccm alkalischen Wassers + 1 ccm m/15 Phosphat suspendiert: b_2. Je 0,5 ccm jeder Fraktion geben im Durchschnitt von 2 Stunden eine Umsatzgröße pro Stunde bei 20° laut folgender Übersicht. Verhältnisse wie in den anderen Versuchen.

Nr.	Bezeichnung der Fraktion	Milchsäure mg	Zuckerveresterung mg	Gesamtumsatz Zucker pro Stunde mg	Eiweiß in 0,5 ccm mg	u'' Gesamtumsatz pro mg Eiweiß mg	u' Milchsäureumsatz pro mg Eiweiß mg
1	A	1,17	0,22	1,39	14,2	**0,096**	**0,081**
2	d	0,014	0,48	0,494	—	—	—
3	d_1	0,294	0,34	0,634	1,1	**0,567**	**0,267**
4	b_2	0,378	0,52	0,90	1,61	**0,556**	**0,241**

In diesem Falle war der Ausgangsextrakt ungewöhnlich stark wirksam ($w = 6{,}05$), was hauptsächlich an der Mitberücksichtigung der Anfangszeit von 15 Minuten lag. (Die Anfangszeit wurde hier für den Ausgangsextrakt mit berücksichtigt, obwohl das Kohlehydrat erst nach Schluß der Hähne eingekippt wurde und in den entsprechenden Versuchen *O. Meyerhofs* diese Anfangszeit von 30 Minuten für die Berechnung der Wirksamkeit außer acht gelassen wurde. Es geschah dies hier wegen des besseren Vergleichs mit den gereinigten Fraktionen, denn in diesen wurde das Kohlehydrat bereits vorher zugegeben, so daß die Berechnung vom Versuchsbeginn an zu geschehen hatte.) Infolge dieser hohen Anfangswirksamkeit erscheint die Konzentrierung weniger hoch. Der Gesamtumsatz in den beiden Fraktionen d_1 und b_2 ist etwa auf das Sechsfache, die Milchsäurebildung etwa auf das Dreifache erhöht.

Versuch 19. 2. Dezember 1926. Kaninchenmuskelextrakt. In diesem Versuch wurde eine bessere Trennung herbeigeführt.

Schema:



22 ccm Extrakt + 6 ccm 0,15 mol. Acetat, p_H 4,4. Fällung *a* abzentrifugiert, in 12 ccm alkalischen Wassers mit 1,5 ccm m/15 Phosphat suspendiert: *d*. Ein Teil der Suspension vom Ungelösten abzentrifugiert, Elution d_1. Die überstehende Lösung *b* (p_H 5,27) + 2,6 g festes KCl + 4 ccm Acetat ergibt ein p_H von 5,05. Die entstehende Fällung abzentrifugiert, in 10 ccm Phosphat + NaOH suspendiert: b_2. Ein Teil vom Ungelösten abzentrifugiert: Elution *e*. Die stündlichen Umsatzgrößen aus der Messungszeit von 3 Stunden sind in der folgenden Übersicht angegeben. Verhältnisse wie in den vorigen Versuchen.

Nr.	Bezeichnung der Fraktion	Milchsäure mg	Zucker-veresterung mg	Gesamt-umsatz Zucker pro Stunde mg	Eiweiß in 0,5 ccm mg	u'' Gesamtumsatz pro mg Eiweiß mg	u' Milchsäure-umsatz pro mg Eiweiß mg
1	A	0,338	0,327	0,665	13,9	**0,048**	**0,024**
2	b_2	0,072	0,265	0,337	—	—	—
3	e	0,092	0,253	0,345	0,37	**0,935**	**0,250**
4	a	0	0,35	0,35	—	—	0
5	d_1	0	0,43	0,43	2,2	**0,81**	0

Der Gesamtumsatz pro 0,5 ccm der Fraktionen *A* und *e* ist in der Abb. 1 wiedergegeben. Man sieht hieraus, daß der Vergleich beider Umsätze für den gereinigten Extrakt noch günstiger ausfällt, wenn man von der Anfangszeit von 15 Minuten absieht.

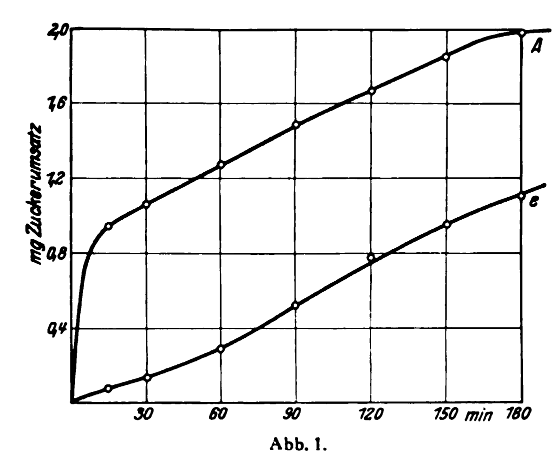


Abb. 1.
Versuch Nr. 19. 2. Dezember 1926.
Verlauf des Kohlehydratumsatzes in mg (Veresterung + Milchsäurebildung) während 3 Stunden.

A: 0,5 ccm Muskelextrakt aus Kaninchenmuskulatur.
e: 0,5 ccm der gereinigten Fraktion des Extraktes, die nur den 37. Teil des Eiweißes wie der Ausgangsextrakt enthält. (Einzelheiten s. Text.) Von den 15′ Anfangszeit abgesehen, ist die Geschwindigkeit des Kohlehydratumsatzes etwa gleich.

Die Wirksamkeit w des Extrakts betrug 2,71. In der besten Fraktion e ist bezüglich des Zuckergesamtumsatzes eine Konzentrierung um das 20fache, bezüglich der Milchsäurebildung um das 10fache eingetreten. Da schon der erste Extrakt eine Konzentrierung des Milchsäure bildenden Ferments gegenüber der zerschnittenen Muskulatur um das Drei- bis Vierfache enthält, ist hier also, auf den Eiweißgehalt bezogen, eine mindestens 30fache Konzentrierung erreicht. Dabei ist die zweifellos nicht genau zutreffende Annahme gemacht, daß die Wirksamkeit direkt mit der Konzentration des Ferments proportional ist. Eine andere Möglichkeit zur Beurteilung des Fermentgehalts ist ja weder hier noch in ähnlichen Fällen gegeben. In weiteren Versuchen soll die Reinigung fortgesetzt und die Bedingungen für die vollständige Wiederaufspaltung des Esters in den gereinigten Fraktionen untersucht werden.

Zusammenfassung.

In der vorliegenden Arbeit werden die Teilbestandteile des Milchsäure bildenden Fermentsystems getrennt und nach Möglichkeit zu reinigen versucht.

1. Ein durch Dialyse von Coferment befreiter, enzymhaltiger Muskelextrakt bedarf zu seiner Wirksamkeit der Anwesenheit

a) zugesetzten Kohlehydrats,

b) gereinigten Coferments,

c) anorganischen Phosphats.

Während das nach *Harden* über Bleiacetat von Phosphat befreite Coferment aus Muskelextrakt nicht in genügend reiner und aktiver Form erhalten wurde, um den dialysierten Extrakt zu aktivieren, gelang die Reinigung von Phosphat mittels $BaCl_2$ und kolloidem $Fe(OH)_3$ in neutraler Lösung. Die Wirksamkeit des Systems: Enzymrückstand + Coferment, die für sich Null ist, wird durch Zugabe von Phosphat bis zu der im Muskelextrakt vorhandenen Konzentration in steigendem Maße aktiviert.

2. Obwohl wahrscheinlich das Coferment der Milchsäurebildung, das mit dem der Gärung identisch ist, gleichzeitig auch als Coferment der Atmung wirkt, ist es nicht möglich, den Muskelrückstand und die cofermenthaltige Fraktion so weit von allen Nährsubstraten zu befreien, daß das System erst durch Kohlehydrat- oder Milchsäurezusatz atmungswirksam wird, vielmehr bleibt eine wohl auf Eiweißverbrennung zurückzuführende Oxydation in dem nach Möglichkeit gereinigten System zurück.

3. Es lassen sich keine Anhaltspunkte für die Beteiligung des Calciums an dem Milchsäure bildenden Ferment finden. Im Muskel-

extrakt finden sich etwa 0,12 mg Calcium pro Kubikzentimeter, die fast undialysabel sind. Durch hemmende Fluorid- oder Oxalatkonzentration wird dies Calcium nicht ausgefällt. Die Hemmungsgröße ist stark von Milieubedingungen abhängig und, wie auch das Auftreten von Trübungen zeigt, wohl auf lyotrope Einflüsse der Salze zurückzuführen.

4. Durch Fällung des Muskelextrakts mit saurem Acetat und Eluierung des Niederschlags mit schwach alkalischem Phosphat läßt sich eine fortschreitende Reinigung des Milchsäure bildenden Ferments erzielen, so daß in den bisher bestgereinigten Lösungen die Konzentration des veresternden und Milchsäure bildenden Ferments, bezogen auf den Eiweißgehalt, gut zehnmal so groß ist wie im Muskelextrakt, der selbst das Ferment schon in der zwei- bis dreifachen Konzentration wie die zerschnittene Muskulatur enthält.

Über die beschränkte Anwendbarkeit der quantitativen Stickstoffbestimmung mit Nesslers Reagens.

Von

B. Sjollema und L. Seekles.

(Aus dem Laboratorium für medizinisch-veterinäre Chemie der Reichsuniversität Utrecht.)

(Eingegangen am 13. Januar 1927.)

Die kolorimetrische Bestimmung des Stickstoffs durch Verwendung von *Nesslers* Reagens — Nesslerisation — hat sich besonders da, wo nur kleine Substanzmengen zur Verfügung stehen, in vielen Laboratorien eingebürgert. Sie kann nur dann richtige Resultate liefern, wenn der Stickstoff vollständig in Ammoniak umgewandelt wird, denn andere basische Stickstoffverbindungen, z. B. Methylamin und Dimethylamin, färben sich nicht mit *Nesslers* Reagens.

Unsere Untersuchungen zeigten nun, daß nicht alle Stickstoffverbindungen bei den üblichen Veraschungsmethoden quantitativ Ammoniak liefern. Weil unter den obengenannten Substanzen auch solche vorkamen, die biochemisch wichtig sind, möchten wir unsere diesbezüglichen Ergebnisse hier mitteilen. Um der Gefahr zu entgehen, daß ein zu kurzes Veraschen eine unvollständige Ammoniakbildung verursacht, haben wir, wie in der Tabelle angegeben ist, in vielen Fällen 4 oder 4½ Stunden mit dem Veraschungsmittel gekocht. In einzelnen Fällen setzten wir der Stickstoffverbindung ein wenig Glucose hinzu. Das Resultat wurde aber dadurch nicht geändert.

Für die kolorimetrischen Bestimmungen bedienten wir uns eines von *Klett* nachgebauten Dubosqkolorimeters.

Methodik.

Die stickstoffhaltige Substanz, meistens 200 mg, wurde im Kjeldahlkolben zerstört durch Kochen mit einer Mischung a) von 10 ccm konzentrierter Schwefelsäure, 1 g Kupfersulfat und 1 g Kaliumsulfat;

b) von 10 ccm konzentrierter Schwefelsäure, 5 g Kaliumsulfat und einem Tropfen Quecksilber; c) von 10 ccm Phosphorschwefelsäure (2 g P_2O_5, gelöst in konzentrierter Schwefelsäure bis 10 ccm) und 1 g Kupfersulfat; d) mit 10 ccm Phosphorschwefelsäure (2 g Phorphorpentoxyd, gelöst in konzentrierter Schwefelsäure bis 10 ccm) und einem Tropfen Quecksilber. Nach 2½- oder nach 4- bis 5stündiger Erhitzung wurde abgekühlt und, falls Stickstoff quantitativ bestimmt werden sollte, mit 300 ccm Wasser verdünnt. Nach Zugabe von 50 ccm einer 33proz. Natronlauge — bei Anwesenheit von Quecksilber überdies noch von 2 g Natriumsulfid — wurde destilliert und das Destillat aufgefangen in 50 ccm n/10 Schwefelsäure.

Nach Verdünnung des Destillats mit destilliertem Wasser auf 500 ccm wurden 250 ccm abgemessen und titriert mit n/10 Natronlauge und in der anderen Hälfte der Ammoniakgehalt kolorimetrisch nach *Nessler* bestimmt.

Dazu wurde 1 ccm des Destillats oder so viel wie nötig war, um die Intensität der entstehenden gefärbten Lösung derjenigen der Vergleichslösung nahezu gleich zu machen, genau abpipettiert und in einem Meßkolben von 100 ccm mit destilliertem Wasser bis auf 70 bis 80 ccm verdünnt. Dann wurden 5 ccm einer 10proz. Natronlauge und 2 ccm *Nessler*scher Lösung[1]) zugegeben, bis zur Marke aufgefüllt, gut gemischt und nach 10 Minuten mit einer Standard-Ammonsulfatlösung verglichen, hergestellt aus 2 ccm Ammonsulfatlösung (0,1 mg Stickstoff enthaltend), mit Wasser, 10proz. Natronlauge und *Nessler*scher Lösung bis 100 ccm in der oben angegebenen Weise aufgefüllt. Immer wurde darauf geachtet, daß die Farbenintensitäten der zu prüfenden Lösung und der Vergleichslösung möglichst gleich waren, denn nur unter diesen Bedingungen sind mit dem *Nessler*schen Verfahren brauchbare Ergebnisse zu erhalten.

In den Fällen, wo auf Methylamin geprüft ist, wurde der Inhalt des Kochkolbens nach Veraschung abgekühlt, 30 ccm Wasser, dann 40 ccm 33proz. Natronlauge zugegeben, von der Mischung 10 ccm überdestilliert und in 10 ccm einer 0,5proz. alkoholischen Lösung von Chlordinitrobenzol (1 : 2 : 4)[2]) aufgefangen. Bei Anwesenheit von Methylamin färbte sich das Destillat sofort gelb. Nach einiger Zeit setzten sich Kristalle ab, welche, nach 24 Stunden abfiltriert und getrocknet, einen Schmelzpunkt von 174⁰ zeigten. Eine Mischung

[1]) Hergestellt aus 75 g KJ in 50 ccm Wasser, 100 g HgJ_2, aufgefüllt mit Wasser bis 500 ccm, von dieser Lösung 300 ccm, dabei 200 ccm NaOH (10proz.) ausgefüllt bis 1 Liter.

[2]) *P. A. Valeton*, Journ. Chem. Soc. **127**, 40, 1924.

der Substanz mit reinem 2, 4-Dinitromethylanilin schmolz immer bei derselben Temperatur.

Unsere Resultate sind in folgender Tabelle, ausgedrückt in Prozenten Stickstoff, zusammengefaßt.

	Titrimetrisch				Kolorimetrisch (*Nessler*)			
	$CuSO_4$ K_2SO_4	$CuSO_4$ P_2O_5	Hg K_2SO_4	Hg P_2O_5	$CuSO_4$ K_2SO_4	$CuSO_4$ P_2O_5	Hg K_2SO_4	Hg P_2O_5
Kreatin	—	—	28,3	—	—	—	—	—
	28,7	—	28,4*)	28,4*)	21,2	—	26,6*)	28,2*)
	—	—	28,3	—	—	—	22,2	—
Kreatinin	33,7*)	33,7*)	—	34*)	32*)	30,5*)	—	34,4*)
	—	—	—	33,9*)	—	—	—	32,7*)
Coffein I**) . . .	27,4	27,4*)	—	27,1*)	17,2	22,7*)	—	25,6*)
	27,5*)	—	—	—	19,5*)	—	—	—
„ II	29,5	29,5*)	—	29,6*)	18	21,3*)	—	26,4*)
Theobromin I†) .	30,3††)	—	31	—	18,2††)	—	23,7	—
	31,3	—	—	—	19,9	—	—	—
	30,6	—	—	—	18,7	—	—	—
„ II . .	31,3*)	—	—	31,3*)	24,7*)	—	—	32,3*)
	31,3*)	—	—	31,0*)	—	—	—	—

*) Es wurde während 4 oder 4½ Stunden destruiert.

**) Weil der Stickstoffgehalt für reines Coffein zu niedrig gefunden wurde, machten wir eine Stickstoffbestimmung nach *Dumas*. Dabei wurden 27,45 Proz. gefunden. Das Präparat ist dann zweimal aus Wasser umkristallisiert. Das gereinigte Coffein (II) enthielt nach einer Dumasbestimmung 29,1 Proz. Stickstoff.

†) Präparat I lieferte durch zweimaliges Umkristallisieren aus Wasser Theobromin II.

††) Er wurde nur kurz destruiert, und zwar ¾ Stunden. Für die beiden anderen Bestimmungen dauerte das Kochen 2½ Stunden.

Wie aus der Tabelle hervorgeht, wurden in Coffein und in Theobromin bei der Nesslerisation immer zu niedrige Zahlen gefunden.

Das Defizit war am größten, wo mit $CuSO_4 + K_2SO_4 + H_2SO_4$ verascht wurde; weniger groß war es, wo P_2O_5 statt K_2SO_4 verwendet wurde. Behandlung mit Hg, P_2O_5 und H_2SO_4 lieferte bei der kolorimetrischen Bestimmung die höchsten Zahlen, aber auch diese waren für Coffein bedeutend zu niedrig.

Nach der Veraschung von Coffein und Theobromin mit $CuSO_4$, K_2SO_4 und H_2SO_4 konnte im Destillat sehr deutlich Methylamin nachgewiesen werden, und zwar viel mehr als Spuren.

Wurde Hg bei der Destruktion verwendet, dann wurde kein Methylamin im Destillat gefunden, auch da nicht, wo ein Stickstoffdefizit konstatiert wurde. Dies war z. B. der Fall bei der Veraschung von Theobromin und von Kreatinin mit Hg, K_2SO_4 und H_2SO_4.

Für Kreatin und Kreatinin waren die Ergebnisse insoweit anders als für Coffein und Theobromin, als beim Kochen mit Hg, P_2O_5 und H_2SO_4 die kolorimetrische Bestimmung Resultate lieferte, welche nicht so viel unter denen der titrimetrischen liegen, wie es beim Coffein und Theobromin der Fall war; dennoch waren die Resultate bei der Nesslerisation immer zu niedrig, wo anders als mit Hg, P_2O_5 und H_2SO_4 verascht wurde.

Die Methylaminprobe wurde für Kreatin und Kreatinin nach Veraschung mit $CuSO_4$, K_2SO_4 und H_2SO_4, bei beiden mit positivem Erfolg, gemacht. Ein negatives Ergebnis wurde, wie schon gesagt, für Kreatinin nach Kochen mit Hg, K_2SO_4 und H_2SO_4 erhalten; also auch hier kein Methylamin, wo Hg verwendet wird.

Daß nicht für alle organischen Stoffe, welche die Methylgruppe enthalten, die Nesslerisation beim Veraschen mit $CuSO_4$, K_2SO_4 und H_2SO_4 zu unrichtigen Resultaten führt, konnten wir mit Dimethylanilin zeigen. Hier war auch die Methylaminprobe negativ.

Wir teilen hier noch die approximativen Zahlen der Methylaminproben mit, damit es deutlich wird, daß es sich hier nicht um geringe Spuren von Methylanilin handelt.

Substanz	Menge mg	Zerstörungsmittel	Menge des kristallisierten Dinitromethylanilins
Theobromin	100	$H_2SO_4-K_2SO_4-CuSO_4$ 2,5 Stunden	40 mg
Kreatinin	100	$H_2SO_4-K_2SO_4-CuSO_4$ 4 Stunden	25 „
Coffein I	200	$H_2SO_4-K_2SO_4-CuSO_4$ 2,5 Stunden	60 mg, mit mehr Dinitrochlorbenzol noch etwa 60 mg, also im ganzen 120 mg
Kreatin	200	$H_2SO_4-K_2SO_4-CuSO_4$ 2,5 Stunden	40 mg, mit mehr Dinitrochlorbenzol noch etwa 20 mg

100 mg Dinitromethylanilin stimmen mit etwa 16 mg Methylamin und mit etwa 7 mg N aus Methylamin überein. Es wurde beim Coffein I also etwa ein Neuntel des Stickstoffs im gefällten Dinitromethylanilin zurückgefunden.

Bei der Analyse von Flüssigkeiten, die neben anderen Stickstoffverbindungen nur wenig von den stickstoffhaltigen Substanzen enthalten, welche nach Veraschung mit dem vielfach verwendeten Gemisch von $CuSO_4$, K_2SO_4 und H_2SO_4 nur einen Teil ihres Stickstoffs bestimmen lassen, wird der Fehler nicht sehr groß sein, wenn es sich um Stoffe, wie Kreatinin handelt, bei denen das Defizit nicht sehr groß ist. Sind jedoch Stoffe wie Coffein, Theobromin und Kreatin, von denen nur etwa zwei Drittel des Stickstoffs bei der Nesslerisation gefunden werden, anwesend, so wird auch da, wo diese Stoffe nur einen kleinen Bruchteil der Stickstoffverbindungen ausmachen, schon bald ein bedeutender Fehler entstehen. Ob bessere Resultate erzielt werden, wenn mehr K_2SO_4 auf einen Teil H_2SO_4 verwendet wird als wir benutzten — z. B. auf 10 ccm H_2SO_4 5 g K_2SO_4 —, haben wir nicht untersucht. Auch die Mischung $CuSO_4$, P_2O_5 und H_2SO_4 lieferte bei unseren kolorimetrischen Versuchen für Coffein, Theobromin und Kreatinin zu niedrige Zahlen.

Fortgeführte Untersuchungen über Maßanalyse, Aussalzbarkeit und spezifische Refraktion der Eiweißkörpergruppen des menschlichen Blutplasmas nebst Bemerkungen über die vergleichende Viskositätsuntersuchung des Blutserums.

Von

W. Starlinger, K. Späth und **E. Winands.**

(Aus der medizinischen Universitätsklinik in Freiburg i. Br.)

(Eingegangen am 13. Januar 1927.)

I. Fragestellung.

In einer Reihe vorausgehender Mitteilungen wurde über Untersuchungen berichtet, die den Zweck verfolgten, eine zusammenfassende theoretische und experimentelle Kritik der methodischen Maßanalyse der Eiweißkörpergruppen des menschlichen Blutplasmas erstmalig darzustellen. Diese Untersuchungen wurden ursprünglich lediglich zum Zwecke eigener Aufklärung durchgeführt, da zur Zeit ihrer Anstellung verschiedenste Methoden zu gleichen Zielen im Rahmen gleicher biologischer und klinischer Fragestellung in Anwendung gebracht wurden, ohne daß eine Abgrenzung ihrer Leistungsfähigkeit und damit die Möglichkeit gegeben war, die solcherweise erhobenen, sich vielfach widersprechenden Ergebnisse auf eine gemeinsame Vergleichsgrundlage zurückführen zu können. Als sich nun im Verlauf dieser Prüfung, die sich zwanglos über mehrere Jahre erstreckte, einerseits Befunde ergaben, die mit manchen, bisher auf Grund alter Angaben ziemlich allgemein anerkannten Anschauungen nicht in Einklang zu bringen waren, andererseits verschiedene Beobachtungen einen allgemeineren methodischen Fortschritt zu bedeuten schienen, wurden die erhobenen Erfahrungen zusammengestellt und mitgeteilt. Die Berechtigung zur Veröffentlichung schien uns schließlich noch dadurch gegeben, daß wir uns auch in Einzelfragen auf ein experimentell erhobenes Material stützen durften, wie es bis dahin von keiner Seite in gleichem Ausmaß beigebracht worden war.

Die Mitteilungen bezogen sich vor allem auf die Methodik der quantitativen Bestimmung der Gerinnungsfraktion [des sogenannten

Fibrinogens][1]) und der Serumeiweißfraktionen [der sogenannten Globuline und Albumine][2]), weiter auf die gemeinsame Bestimmung aller drei Fraktionen im Rahmen besonders expeditiver Bedingungen[3]), schließlich auch auf die hierhergehörigen Beziehungen verschiedener Serumarten zueinander[4]) und die vergleichende Viskositätsuntersuchung des Serums[5]). Es wurde ausgeführt, daß die klassische Neutralsalzfraktionierung der zirkulierenden Eiweißkörper, wie wir sie *Hammarsten* und der Schule *Hofmeisters* verdanken, auch heute noch die sicherste Möglichkeit bietet, die Gesamtmenge des Eiweißes in einige große Gruppen zu zerlegen, die wenigstens ihrem Hauptteil nach durch bestimmte physiko-chemische, konstitutiv-chemische und immunbiologische Eigenschaften, sowie durch bestimmte biologische und klinische Gesetzmäßigkeiten gekennzeichnet werden können; es wurde weiter der Ammonsulfatfraktionierung der unbedingte Vorzug vor den anderen gebräuchlicheren Trennungsverfahren durch Magnesiumsulfat und Natriumsulfat eingeräumt, und schließlich die im Rahmen besonderer Bedingungen durchzuführende Wägeanalyse aus Gründen der Expeditivität bei gleicher, sogar unter Umständen größerer Zuverlässigkeit der Stickstoffbestimmung vorgestellt, während die meisten optischen Verfahren, vor allem die verbreitete Refraktometrie und kombinierte Viskosirefraktometrie, infolge grundsätzlicher Fehlermöglichkeit abgelehnt werden mußten.

Diese Hauptergebnisse: der Vorzug der Ammonsulfatfraktionierung vor den anderen Trennungsverfahren bzw. der ungleiche Fällungseffekt in solcher Hinsicht als gleichwertig angenommener Salzkonzentrationen in pathologischen Menschenplasmen, weiter der Vorzug der Wägeanalyse auch unter vereinfachten, der biologischen Serienuntersuchung angepaßten Bedingungen, schließlich die ungenügende Leistungsfähigkeit der Verfahren, die auf der Bestimmung des Brechungsvermögens aufgebaut wurden, standen also zur Diskussion und wurden inzwischen mehrfach einer solchen unterworfen. Da nun im Rahmen solcher Stellungnahme auch Befunde mitgeteilt und Ansichten vertreten wurden, die unseren Ergebnissen zu widersprechen scheinen, da weiter die Entscheidung dieser strittigen Fragen für die Beurteilung des Verhaltens der zirkulierenden Eiweißkörper des Blutes grundsätz-

---

[1]) *W. Starlinger*, Mitteilung I und II, diese Zeitschr. **140** und **148**, 1923; *W. Starlinger* und *K. Hartl*, Mitteilung III, ebendaselbst **157**, 283, 1925.

[2]) *W. Starlinger* und *K. Hartl*, Mitteilung I bis III, diese Zeitschr. **160**. 113, 129, 147, 1925.

[3]) *W. Starlinger*, ebendaselbst **168**, 423, 1926.

[4]) *Derselbe*, Mitteilung I, ebendaselbst **153**, 144, 1924; *W. Starlinger* und *U. Strasser*, Mitteilung II, ebendaselbst **160**, 417, 1925.

[5]) *W. Starlinger* und *K. Hartl*, ebendaselbst **160**, 225, 1925.

liche Wichtigkeit beanspruchen darf, die Bedeutung der Bewertung dieser Eiweißkörper aber immer mehr erkannt und berücksichtigt wird, scheint es erlaubt und berechtigt, die früheren eigenen und inzwischen erhobenen fremden Befunde einer vergleichenden Kritik zu unterwerfen und über das Ergebnis neuerer, in gleicher Richtung weitergeführter eigener Untersuchungen zu berichten. Die vergleichende kritische Betrachtung aber scheint uns besonders nötig, da von manchen Autoren Schlußfolgerungen gezogen wurden, mit denen die erhobenen Befunde unseres Erachtens nicht in Einklang gebracht werden können.

Es wird also in drei Abschnitten zu erörtern und zu prüfen sein:

1. Das Leistungsvermögen der vereinfachten Wägeanalyse;

2. das Fällungsvermögen der wichtigsten Trennungssalze in pathologischen menschlichen Plasmen;

3. die Eignung der Refraktometrie und ihrer verwandten Verfahren für die Maßanalyse der Eiweißkörper bzw. das Bestehen einer einheitlich konstanten spezifischen Refraktion der letzteren.

Schließlich soll anhangsweise zu einigen hierhergehörigen Fragen, die sich auf die vergleichende Viskositätsuntersuchung des Blutserums beziehen, Stellung genommen werden.

Bevor wir jedoch auf diese einzelnen Abschnitte eingehen, möchten wir noch eine allgemeine Bemerkung vorausschicken:

Wir haben seinerzeit den Vorschlag gemacht, „an Stelle der im Streit der Meinungen stehenden Bezeichnungen“: Fibrinogen—Globulin—Albumin, die von verschiedenen Autoren je nach der jeweils verwendeten Trennungsgrundlage völlig verschieden verstanden wurden und werden, „nichts präjudizierende Ausdrücke“ treten zu lassen, die nur Tatsächliches, klar Definiertes enthalten: also „Gerinnungsfraktion“ (oder bei Abtrennung durch Ammonsulfat „28vol.-proz. Sättigungsfraktion“) statt Fibrinogen, „Ammonsulfathalb-“ oder „Natriumsulfathalb-“ oder „Magnesiumsulfatganzsättigungsfraktion“ statt Globulin, „Ammonsulfatganz-“ oder „Natriumsulfatganzsättigungsfraktion“ statt Albumin zu sagen.

Dieser Tendenz, „die Begriffe Globulin und Albumin fallen zu lassen“, wurde von *E. A. Hafner*[1]) widersprochen, „da wir heute ganz allgemein von der Relativität dieser Begriffe überzeugt wären und bekannte Forscher dieselben Begriffe mit Erfolg verwendet hätten“; ferner, „weil der konventionell gebildete Begriff nicht nur biologisch seine Berechtigung hätte, sondern auch physikalisch-chemisch klar definierbar wäre.“.

Demgegenüber möchten wir nun ausdrücklich betonen, daß unser Vorschlag lediglich den Zweck verfolgte, eine klare Verständigung

[1]) *E. A. Hafner*, diese Zeitschr. **165**, 29, 1925.

anzubahnen, daß er also nicht in Ermangelung „historischen Feingefühls“ die Namengebung klassischer Forscher verwerfen wollte; eine klare beigeordnete Begriffsdefinition zu verlangen, schien uns aber gerade aus der allgemeinen Überzeugung von der Relativität des Sprachgebrauchs und -begriffs ableitbar. Daß jede der großen Eiweißkörpergruppen ihrer Hauptmenge nach eine verhältnismäßig sicher physikalisch-chemisch definierbare Einheit bildet, scheint auch uns wahrscheinlich und wurde von uns immer vertreten; daneben aber dürfte es, so wie in jedem biologischen System Übergänge vorkommen, auch hier Übergangs- oder Grenzfraktionen geben, die zur Nachbarhauptfraktion überleiten, also Übergangseigenschaften besitzen, und so unter verschiedenen Bedingungen des umgebenden Milieus (anscheinend nicht zum wenigsten auch bei verschiedenartiger Aussalzung) einmal dieser, das andere Mal jener Hauptfraktion zugehörig werden. Solche Verhältnisse werden aber in Hinsicht auf die vorliegende Fragestellung nur dann klar ausgedrückt, wenn der Effekt der Fraktionierung durch die Art der Fraktionierung definiert wird.

Im folgenden soll nun in die Erörterung der eingangs ausgeführten Einzelfragen eingetreten werden und dabei zuerst die Frage des Standardverfahrens, in unserem Falle also der Wägeanalyse, Berücksichtigung finden, da ihre Entscheidung auch für die folgenden Kapitel die methodische Beurteilungsgrundlage erst vermittelt.

II. Das Leistungsvermögen der vereinfachten Gewichtsanalyse der Eiweißkörpergruppen.

Vorausgeschickt sei, daß im folgenden nur mehr die Gewichtsanalyse der beiden Haupteiweißkörpergruppen des Blut*serums*, also der sogenannten Globuline und Albumine, berücksichtigt werden muß, während auf die Bestimmung der Gerinnungsfraktion, des sogenannten Fibrinogens, nicht mehr eingegangen werden braucht, da diese in ihrer Zuverlässigkeit und Expeditivität nicht anfechtbar ist und auch bisher nicht angefochten wurde; die Übereinstimmung der Ergebnisse der Gravimetrie und Stickstoffbestimmung, die bei der Bestimmung der Gerinnungsfraktion ebenso expeditiv verläuft, ist eine vollkommene.

Weiter möchten wir vorausschicken, daß wir bei Veröffentlichung unserer vereinfachten Gewichtsanalyse der *Serum*eiweißkörpergruppen ausdrücklich betonten, daß wir kein neues Verfahren, sondern lediglich eine solche Modifikation der klassischen gravimetrischen Methodik mitteilen wollten, die den Anforderungen der biologisch-klinischen Serienuntersuchung im Sinne genügender Zuverlässigkeit und Handlichkeit auf Grund eigener Erfahrungen voll entspricht. Unsere Aufgabe mußte also sein, zu erproben, in welchem Ausmaß technische Hemmnisse

der Serienbestimmung (Wägung auf der analytischen Wage, Veraschung usw.) verringert oder gar ausgeschaltet werden könnten, ohne das erlaubte Maß der Fehlermöglichkeit zu überschreiten. Die entsprechenden Versuche wurden seinerzeit ausführlich mitgeteilt, ihre Ergebnisse führten zu folgendem Verfahren:

Das zu analysierende Serum (natives Vollblut-, natives Plasma-, rekalzifiziertes Citratserum) wird (im Falle vorausgehender Verdünnung unter entsprechender Berücksichtigung dieser Verdünnung) zuerst genügend (mindestens dreifach) mit Wasser verdünnt, darauf mit gleicher Menge gesättigter Ammonsulfatlösung halbgesättigt und nach einiger Zeit scharf zentrifugiert; darauf wird die überstehende klare Flüssigkeit, die nunmehr die Ganzsättigungsfraktion gelöst enthält, in bekannter Menge abgehoben, mit gleicher Menge einer etwa m/25 Essigsäure versetzt und im Wasserbad koaguliert; schließlich wird das koagulierte Eiweiß in vorgewogenen, wasserfreien Schleicher-Schüll-Blaubandfiltern aufgefangen, mit destilliertem Wasser bis zur negativen Sulfatreaktion gewaschen, je einmal mit Alkohol und Äther gespült und mit dem Filter getrocknet und gewogen. Ebenso wird im gleichen Serum ohne vorausgehende Fraktionierung der Gesamteiweißgehalt bestimmt.

Als Serummengen genügen 1,0 ccm für die Ganzsättigungsfraktionsbestimmung, 0,5 ccm für die Gesamteiweißbestimmung; doch können diese Mengen bei sorgfältigem Arbeiten noch um die Hälfte verringert werden.

Die Trocknung der unbeschickten und beschickten Filter erfolgt bei genügender Wägetechnik bis zu vier Filter in einer Petrischale, bei ungenügender Wägetechnik einzeln in Wägegläschen durch 1 Stunde bei 105°. Die Wägung erfolgt auf der Torsionswage.

Gegen dieses Verfahren wurden nun von *Arndt* und *Hafner*[1]) einerseits, von *Petschacher*, *Berger* und *Schretter*[2]) andererseits folgende Einwendungen erhoben:

Arndt und *Hafner* sagten:

1. daß es, wie „*Starlinger* und *Hartl* selbst angeben", nicht möglich wäre, „den Eiweißverlust beim Waschen völlig auszuschließen";

2. daß durch das nur einmalige Nachwaschen mit Alkohol und Äther eine genügende Entfernung der am Eiweißkoagulum anhaftenden Lipoide nicht erzielt werden könne.

Petschacher, *Berger* und *Schretter* wiederholten den letzteren Einwand, dehnten ihn auch auf anhaftende Salze aus und fügten hinzu, daß

3. durch die „offene" Wägung auf der Torsionswage große „Filterfehler" durch Wasseranziehung der Filter während der Wägung entstünden.

Diesen Einwendungen müssen wir folgendes entgegenhalten:

Zu 1. *Arndt* und *Hafner* lehnen unsere vereinfachte Gewichtsanalyse auf Grund der ausgeführten theoretischen Kritik ab, ohne anscheinend selbst das Verfahren aus eigener Übung zu kennen; sie postulieren einen Eiweißverlust während des Nachwaschens unter Berufung auf uns selbst.

---

[1]) *Arndt* und *Hafner*, diese Zeitschr. **167**, 440, 1926.

[2]) *Petschacher*, *Berger* und *Schretter*, Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **50**, 1926.



Diese Berufung ist jedoch nicht verständlich, denn wir haben den Eiweißverlust nur dann beobachtet, wenn bei gleichzeitiger direkter Mitbestimmung der Halbsättigungsfraktion der Niederschlag dieser Fraktion lange mit halbgesättigter Lösung nachgewaschen werden mußte, um ihn vom anhaftenden Ganzsättigungseiweiß zu befreien; in diesem Falle erfährt verständlicherweise das die Ganzsättigungsfraktion enthaltende Filtrat eine solche Vermehrung des Salzes, daß die Filterung des koagulierten Filtrats nunmehr um ein Vielfaches verlängert, verzögert und erschwert wird und solcherweise in der Tat manchmal Eiweißverluste auftreten. Aus diesem Grunde haben wir auf die direkte Bestimmung der Halbsättigungsfraktion verzichtet, dadurch das Nachwaschen mit halbgesättigter Salzlösung erspart und solcherweise die Salzmenge im Halbsättigungsfiltrat auf etwa ein Zehntel herabgesetzt. Die notwendige Wasserspülung des koagulierten Eiweißes wird dadurch so verkürzt, „daß der Eiweißverlust ausgeschaltet oder wenigstens auf ein Minimum beschränkt wird". Tatsächlich ist das Filtrat immer wasserklar und zeigt auch bei Zusatz von Alkaloidreagenzien nur in Ausnahmefällen eine kaum erkennbare Opaleszenz, die bekanntlich Eiweißmengen entspricht, welche sich der quantitativen Erfassung entziehen. Doch sind diese Fälle so selten, daß man bei ihnen eher an eine ungenügende Koagulation oder an eine ungenügende Filterhärtung denken möchte. Dieser Sachverhalt wurde von uns durch die ausdrückliche Betonung der „Beseitigung des Eiweißverlustes" der früheren Methodik, die in der erwähnten Mitteilung wenige Seiten vorher entsprechend den vorstehenden Ausführungen kritisiert wurde, so eindeutig klargelegt, daß wir nicht verstehen können, wie *Arndt* und *Hafner* uns selbst als Kronzeugen des von ihnen theoretisch supponierten Eiweißverlusts anführen können.

Zur theoretischen Erklärung dieses tatsächlich gar nicht erfolgenden Eiweißverlustes verweisen die Autoren auf seine Abhängigkeit vom Dispersitätsgrad der gefällten Eiweißteilchen, welcher auch bei Verwendung des gleichen Fällungsmittels und unter Konstanterhaltung aller übrigen Faktoren bei verschiedenen pathologischen Zuständen in weitestem Maße schwanke. Diese Ausführung trifft jedoch, wie wir auf Grund einer Erfahrung von vielen Hundert Stabilitätsprüfungen an pathologischen Menschenplasmen aus früheren Jahren mit Sicherheit behaupten dürfen, nur auf Eiweißfällungen reversibler Natur zu, wie sie z. B. durch Neutralsalze bewirkt wird, gilt jedoch nicht für massive irreversible Koagulation, bei welcher von einem Dispersionsgrad der Fällung eigentlich nicht mehr gesprochen werden kann, wie beispielsweise in unserem Falle der Hitzekoagulation; hier ist die Teilchengröße, wenn man von einer solchen überhaupt noch reden darf, im Verhältnis zur Porengröße des gehärteten Filters so groß, das etwaige Dispersitätsunterschiede außer jeder Betrachtung bleiben können. Im übrigen bedarf es wohl keines weiteren Beweises, daß bestgehärtete (Blauband-) Filter hitzekoaguliertes Eiweiß quantitativ zurückzuhalten vermögen, wenn Salzkonzentrationen, welche die Filterporen schädigen, vermieden werden, wie es eben durch Verzicht auf die direkte Bestimmung der Halbsättigungsfraktion geschah.

Damit scheint uns der erste Einwand erledigt.

Zu 2. Auch dieser Einwurf wurde von beiden Autorengruppen nur theoretisch formuliert; er läßt sich jedoch bereits aus der vorliegenden Literatur widerlegen, da es bekannt ist, daß die Plasmaphosphatide bei Hitzekoagulation des Plasmaeiweißes zur Gänze, die Sterine zum weitaus größten Teile in das Filtrat übergehen, während der Rest der Sterine mit

dem Eiweiß der Halbsättigungsfraktion vereinigt bleibt. Ich brauche in diesem Zusammenhang nur die sorgfältigen Untersuchungen *Handovskys*[1]) anzuführen; er schreibt: „Fällt man die Gesamteiweißkörper durch Hitzegerinnung mit verdünnter Säure oder durch Ganzsättigung mit Ammonsulfat, dann sind die ganzen Phosphatide im Filtrat nachweisbar und vom Cholesterin ebensoviel wie im Filtrat nach Globulinflockung, das sind 70 bis 80 Proz." Aus diesem experimentellen Ergebnis *Handovskys* ergibt sich also, daß das koagulierte Eiweiß der Ganzsättigungsfraktion überhaupt lipoidfrei ist, ein Lipoidfehler also gar nicht in Betracht gezogen werden braucht, weiter, daß die am Globulin haftende, bei unserer Gesamteiweißbestimmung also etwa Fehler bedingende Lipoidverunreinigung, selbst wenn die Alkohol-Ätherspülung gar keinen Einfluß entfalten würde, so geringe Wirkung ausüben würde, daß sie ebenfalls nicht berücksichtigt werden muß. Denn wenn beispielsweise der mittlere Gesamteiweißgehalt mit etwa 7 g-Proz., der mittlere Gesamtcholesteringehalt mit etwa 0,150 g-Proz. veranschlagt würde, könnte die anhaftende Verunreinigung höchstens 0,03 g-Proz. Fehler verursachen, würde also nicht einmal ein halbes Hundertstel der Gewichtsmenge des Gesamteiweißes erreichen.

Was weiter die Fehlerquelle durch ungenügende Entfernung der anhaftenden Salze anlangt, die von *Petschacher, Berger* und *Schretter* wieder nur theoretisch konstruiert wird, während wir seinerzeit diese Fehlermöglichkeit in zehn genauen Aschenanalysen kontrollierten, so brauchen wir nur auf das Ergebnis dieser Untersuchungsreihe verweisen, demzufolge im Rahmen unserer Methode die Aschenrückstände bei negativer Sulfatreaktion um 0,0003 g schwanken, im Rahmen der angestrebten Genauigkeit also vernachlässigt werden dürfen.

Damit scheinen uns auch diese Einwände erledigt.

Zu 3. *Petschacher, Berger* und *Schretter* erklären es erstlich für unmöglich, zur Gewichtskonstanz getrocknete, im Exsikkator abgekühlte Filter auf der Torsionswage ohne wesentlichen Feuchtigkeitsfehler zur Auswägung zu bringen. Wir haben zu diesem Einwand, den wir uns verständlicherweise selbst gestellt haben, bemerkt: „Die Wägung auf der Torsionswage muß und kann so rasch erfolgen, daß die Luftfeuchtigkeit, die nach 1 Minute bereits einen Wägefehler bis 0,002 g nach sich ziehen kann, keinen Einfluß auszuüben vermag. Die Wägung eines Filters ist auf der Torsionswage in wenigen Sekunden ausführbar". Wir können dieser damaligen Bemerkung auch heute nichts hinzufügen und daher nur nochmals ausdrücklich betonen, daß es mit einiger Übung ausnahmslos möglich ist, die Filter in der angegebenen Weise und Zeit ohne Wasserfehler zu wägen. Wir haben, bevor wir zur Torsionswage übergingen, uns immer wieder von der völligen Übereinstimmung der Filterwägung im Wägegläschen auf der analytischen Wage und offen auf der Torsionswage im Rahmen der Genauigkeit der Torsionswägung, die wir mit ± 0,00025 g beziffern möchten, überzeugt, ebenso wie wir auch bei wiederholter Trocknung und Wägung auf der Torsionswage immer gleiche Werte beobachteten. Wir können also mit Sicherheit behaupten, daß in 4 bis 5 Sekunden, welche Zeit eine Filterwägung beansprucht, die Einflußnahme der Luftfeuchtigkeit unter dem methodischen Wägefehler bleibt, vorausgesetzt, daß die Wägung bei Luftfeuchtigkeitsgraden, wie sie in Wägezimmern üblich sind, durchgeführt wird.

[1]) *Handovsky*, Pflügers Arch. 1925, S. 210.



Die Autoren nehmen weiter Stellung gegen das „serienweise Abwägen“ der Filter, worunter die gleichzeitige Trocknung bis zu vier Filtern zu verstehen ist. Die Petrischale soll dabei nach unserer Vorschrift unmittelbar vor der Wägung dem Exsikkator entnommen und darauf bei jeder Filterentnahme der Deckel der Schale nur so weit gelüftet werden, daß eine kleine Pinzette das Filter eben entnehmen kann. Wir geben zu, daß dieses Verfahren von vornherein ein gewisses Mißtrauen zu erwecken imstande ist, da man vermuten könnte, daß hier die Luftfeuchtigkeit doch größeren Einfluß ausüben müßte. Wir können jedoch auf Grund vielfacher Kontrollen sagen, daß diese Einflußnahme bei sorgfältiger Arbeit tatsächlich nicht erfolgt, wie wir ja überhaupt immer wieder ausdrücklich betonen möchten, daß alle diese kleinen technischen Vorteile, die im Zusammenhang eben erst die angestrebte Expeditivität bewirken, immer erst nach genauester experimenteller Prüfung dauernd angewendet und schließlich mitgeteilt wurden; so haben wir auch im vorliegenden Falle die Trocknung im Einzelwägegläschen erst verlassen, nachdem wir von der Ungefährlichkeit der Simultanwägung genügend überzeugt waren. Wer jedoch diese technische Vereinfachung nicht sicher zu beherrschen meint, wird besser die Einzelwägung im Wägegläschen bevorzugen.

Damit scheinen uns auch die letzten Einwendungen erledigt.

Wenn gegen ein maßanalytisches Verfahren kein grundsätzlicher Einwand erhoben werden kann, ist es üblich, einerseits die gewonnenen Resultate mit den Resultaten eines anderen gleichgeordneten Verfahrens zu vergleichen, andererseits die Differenzabweichung zwischen Parallelbestimmungen festzulegen. Grundsätzliche Einwendungen lassen sich gegen unsere vereinfachte Wägeanalyse nicht vorbringen bzw. wenn sie vorgebracht werden, wie im vorstehenden leicht entkräften, so daß also nun der Vergleich mit der Leistung gleichgeordneter Verfahren und der Vergleich von Parallelbestimmungen durchzuführen bleibt.

Als gleichgeordnetes Verfahren kommt derzeit entsprechend unserer seinerzeitigen Beweisführung und in Anbetracht der ungenügenden Leistungsfähigkeit der optischen Verfahren (mit Ausnahme der Nephelometrie, die aber noch nicht genügend erprobt scheint) lediglich die Stickstoffbestimmung in Betracht. Wir haben nun seinerzeit einen unmittelbaren Vergleich der Gewichtsanalyse und Stickstoffanalyse der Ammonsulfatfraktionen für kaum durchführbar erklärt, weil uns die Stickstoffbestimmung bei Anwesenheit bzw. bei nicht sicher genügender Entfernung der Ammonsalzmengen nicht unbedenklich erschien; hinsichtlich des Vergleichs der Wäge- und Stickstoffanalyse im allgemeinen aber haben wir auf die eigenen diesbezüglichen Vergleichsbestimmungen der Gerinnungsfraktion verwiesen, die in 35 Parallelbestimmungen eine mittlere Differenz von 0,03 g-Proz. ergeben hatte; gleiche Ergebnisse haben wir auch wiederholt bei Parallelanalysen des Serum-Gesamteiweißgehalts und anderer Eiweißkörper (Caseinate) erhalten. Wir haben immer die gleichzustellende Zuverlässigkeit der Wäge- und Stickstoffbestimmung betont und lediglich die unter Umständen größere Expeditivität der ersteren hervorgehoben. Wir müssen auf diese Stellungnahme deshalb zurückkommen, weil anscheinend mancherorts angenommen wurde, daß wir die Stickstoffanalyse verdrängen wollten.

Petschacher, *Berger* und *Schretter* haben sich inzwischen in die *Cullen-van Slyke*sche Methode eingearbeitet, die es erlauben soll, die Eiweißanalyse trotz verwendeter Ammonsulfatfraktionierung im Rahmen der Stickstoffbestimmung durchzuführen; sie berichten über gute Resultate, deren Kritik uns nicht zusteht, nachdem wir diese Methode selbst niemals geübt haben, da sie uns, wie schon ausgeführt, nicht ohne schwer vermeidbare Fehlermöglichkeiten anwendbar schien. Mit den Resultaten dieser Methode haben nun die Autoren die gleichzeitig mit unserer Methode erhobenen Resultate in sieben Fällen verglichen und dabei Abweichungen von — 1,3 bis + 1,4 g-Proz. beim Gesamteiweißgehalt, von — 1,4 bis + 2,2 g-Proz. bei der Ganzsättigungsfraktion gefunden. Gleichzeitig beobachteten sie in derselben Versuchsreihe, in welcher auch die Gravimetrie parallel in Doppelbestimmungen durchgeführt wurde, daß „der Unterschied in einigen Fällen die von *Starlinger* und *Hartl* angegebenen mittleren Werte von ± 0,12 g-Proz. überstieg.“ In welchem Ausmaße diese Abweichung beobachtet wurde, ist leider nicht angegeben.

Wir können für diese auffallend hohen Differenzen zwischen den Resultaten der Wäge- und Stickstoffbestimmung, wie wir sie selbst niemals sahen, keine andere Erklärung abgeben, als daß die Gewichtsanalyse nicht unter entsprechenden Bedingungen durchgeführt wurde. Für diese Auffassung scheint uns zu sprechen, daß die Autoren ihrem besprochenen „Filterfehler“, der von uns nie beobachtet wurde, so großen Wert zubilligen und in ihren gravimetrischen Doppelanalysen größere (um wieviel größere, wissen wir leider nicht) Differenzen sahen als wir angegeben hatten.

Wir selbst haben seinerzeit in je 33 Doppelanalysen des Gesamteiweißgehalts und der Ganzsättigungsfraktion je eine mittlere ±-Abweichung von ± 0,12 g-Proz. gefunden. Diese Analysen wurden im Vollblutserum durchgeführt. Wir haben später denselben Vergleich neuerlich auch im rekalzifizierten Citratserum unternommen und in 32 Parallelanalysen eine mittlere ±-Abweichung von ± 0,12 g-Proz. beim Gesamteiweißgehalt, von 0,07 g-Proz. bei der Ganzsättigungsfraktion gefunden. Wir verfügten also vor der Mitteilung *Petschacher, Berger* und *Schretters* über insgesamt 65 Doppelanalysen, die eine mittlere ±-Abweichung von ± 0,12 g-Proz. für das Gesamtserumeiweiß, von ± 0,10 g-Proz. für die Ganzsättigungsfraktion ergeben hatten.

Da nun diese Autoren bemerken, „eine eingehendere Diskussion dieser Resultate nicht geben zu können, da sie ohne Angabe genauer Protokolle nur summarisch mitgeteilt wurden“, was von uns aus Gründen der Raumersparnis geschah, da wir über das Ergebnis von insgesamt mehreren hundert Untersuchungen zu berichten hatten, sind wir im folgenden gezwungen, eine neuerliche, inzwischen unbeabsichtigt durchgeführte Vergleichsserie (da wir unsere klinischen Analysen häufig als Doppelanalysen durchführen) ausführlich anzugeben: Die erste Serie umfaßt 44 Doppelanalysen des Gesamteiweißgehalts und 37 Doppelanalysen der Ganzsättigungsfraktion bei Verarbeitung rekalzifizierten Citratserums die zweite 38 Doppelanalysen des Gesamteiweißgehalts und der Ganzsättigungsfraktion bei Verwendung von Vollblutserum. Dabei wurden folgende Unterschiede beobachtet:

Bei Bestimmung des Gesamteiweißgehalts im Rahmen der ersten Serie bei absoluten Gesamteiweißmengen zwischen 6,50 und 8,68 g-Proz.:

fünfmal 0; sechsmal 0,01; 0,02; 0,03; zweimal 0,04; 0,06; 0,07; 0,08; 0,09; 0,10; 0,11; 0,12; dreimal 0,14; zweimal 0,15; 0,18; 0,23; 0,25; 0,30; 0,33; 0,35; 0,36; 0,65; im Mittel also 0,11 g-Proz.;

im Rahmen der zweiten Serie bei absoluten Gesamteiweißmengen zwischen 5,48 und 8,70 g-Proz.:

zweimal 0,02; dreimal 0,03; 0,05; sechsmal 0,07; viermal 0,08; 0,10; sechsmal 0,12; fünfmal 0,13; zweimal 0,15; 0,17; 0,18; 0,22; 0,25; 0,27; im Mittel also 0,11 g-Proz.;

bei Bestimmung der Ganzsättigungsfraktion im Rahmen der ersten Serie bei absoluten Eiweißmengen zwischen 1,24 und 5,67 g-Proz.:

fünfmal 0,01; viermal 0,02; dreimal 0,03; 0,05; zweimal 0,06; dreimal 0,07; zweimal 0,08; 0,11; 0,12; 0,15; 0,17; 0,18; 0,19; viermal 0,20; 0,21; 0,22; 0,28; 0,29; 0,33; im Mittel also 0,11 g-Proz.;

im Rahmen der zweiten Serie bei absoluten Eiweißmengen zwischen 3,02 und 6,75 g-Proz.;

0; dreimal 0,02; fünfmal 0,05; zweimal 0,07; fünfmal 0,08; viermal 0,10; zweimal 0,12; viermal 0,13; zweimal 0,15; 0,17; 0,18; 0,20; dreimal 0,23; 0,23; zweimal 0,25; im Mittel also 0,11 g-Proz.

Die mittlere ±-Abweichung betrug demzufolge bei dieser neuerlichen Prüfung von 82 Fällen für das Gesamteiweiß ± 0,06, von 75 Fällen für die Ganzsättigungsfraktion ± 0,06. Es wurde also ein noch besseres Endergebnis erzielt als in unseren früheren Vergleichsreihen, was wohl der größeren technischen Erfahrung zugeschrieben werden darf.

Fügen wir nun diesen neueren unsere früheren Resultate an, so umfaßt unser derzeitiges statistisches Gesamtmaterial insgesamt 147 Doppelanalysen des Gesamteiweißes mit einer mittleren ±-Abweichung von ± 0,09 g-Proz. und 140 Doppelanalysen der Ganzsättigungsfraktion mit einer mittleren ±-Abweichung von ± 0,08 g-Proz. und steht solcherweise sieben Parallelanalysen *Petschacher-Berger-Schretters* mit gleicher Methodik gegenüber, in denen „der Unterschied in einigen Fällen den mittleren Wert von ± 0,12 g-Proz. übertraf". Wir glauben daher, auf Grund dieses Vergleichs keine Ursache zu haben, unsere seinerzeitigen Angaben revidieren zu müssen.

Wenn *Petschacher*, *Berger* und *Schretter* weiter angeben, daß im Rahmen ihres modifizierten Verfahrens nach *Cullen-van Slyke* infolge ungenügender Entfernung des Ammonsalzes oder gleichgeordneter Fehlermöglichkeiten Abweichungen zur Beobachtung kommen, die in neun Parallelanalysen einer mittleren Fehlabweichung von ± 0,05 g-Proz. entsprachen, und im Rahmen der obengenannten Methodik in 17 Parallelanalysen des Gesamteiweißes eine ±-Abweichung von ± 0,04 g-Proz., in 13 Parallelanalysen der Ganzsättigungsfraktion eine solche von ± 0,03 g-Proz. verzeichnen, so dürfen sie berechtigterweise die Zuverlässigkeit dieser Methodik hoch einsetzen, und wir geben gern zu,

daß ihre Fehlabweichung absolut um die Hälfte kleiner ist als die von uns mit der vereinfachten Wägeanalyse an einem allerdings zehnmal größeren Material gefundene Divergenz. Dieser absolute Unterschied der Ziffern scheint uns jedoch methodisch völlig belanglos, da die von uns erreichte Genauigkeit bereits so hochgetrieben ist, daß die anzustrebende Genauigkeit überboten wird.

Wird nun schließlich noch bedacht, daß die technische Handlichkeit der vereinfachten Wägeanalyse die der N-Bestimmung im Rahmen des modifizierten *Cullen-van Slyke*schen Verfahrens weitaus übertrifft, welches Urteil sich bereits aus der Nebeneinanderstellung beider Verfahren ergibt und wohl nicht näher ausgeführt werden muß, so glauben wir berechtigterweise annehmen zu dürfen, daß unsere seinerzeitige Schlußfolgerung auch heute ebenso wie damals völlig zu Recht besteht; sie lautet dahin, daß die vereinfachte Wägeanalyse, da sie einerseits ein Maß der Zuverlässigkeit bietet, welches die erforderliche Zuverlässigkeit übersteigt und die der N-Analyse in der Größenordnung erreicht, andererseits eine technische Expeditivität besitzt, welche die der gleich zuverlässigen Methoden übertrifft, derzeit für die biologisch-klinische Serienuntersuchung als Methode der Wahl empfohlen werden darf.

III. Der Vergleich des Trennungsvermögens gleichgeordneter Salzkonzentrationen des Ammonsulfats, Magnesiumsulfats und Natriumsulfats.

Für die Bestimmung der Gerinnungsfraktion kommt diese Fragestellung nicht in Betracht, weil einerseits Spontangerinnung, Rekalzifikation oder Wärmefällung bei 56° ein besseres Kriterium darstellen als die Salzfraktionierung, und andererseits gleichgeordnete Fällungskonzentrationen, die der 28 vol.-proz. Sättigung mit Ammonsulfat entsprechen, für Magnesium- und Natriumsulfat unseres Wissens bisher nicht zur Prüfung und Feststellung kamen. Da weiter auch kein Bedürfnis nach einer derartigen Untersuchung und Entscheidung besteht, braucht sie vorerst keiner Erörterung und experimentellen Prüfung zugeführt werden. Für die Salzfraktionierung der Serumeiweißkörper hingegen wird der Ammonsulfathalbsättigung die Magnesiumsulfatganzsättigung [*Hammarsten*[1])], seit *Pinkus*[2]) und *Porges-Spiro*[3]) auch die Natriumsulfathalbsättigung bei 34° ganz allgemein als gleichwertig gegenübergestellt; die letztere wurde neuerdings von *Howe*[4]) wieder geprüft und in ihrer Brauchbarkeit bestätigt.

[1]) *Hammarsten*, Pflügers Arch. 1878.
[2]) *Pinkus*, Journ. of Phys. 27, 1901.
[3]) *Porges* und *Spiro*, Hofmeisters Beitr. 3, 1903.
[4]) *Howe*, Journ. of biol. Chem. 49, 1921.

Da aber von allen diesen Untersuchern die Prüfung der Fällungswirkung gleichwertiger Konzentrationen dieser verschiedenen Salze an einem Untersuchungsmaterial menschlicher Herkunft niemals durchgeführt wurde, die erwähnte Korrelation vielmehr bestenfalls aus dem Vergleich einiger Analysen normaler Tierseren abgeleitet[1], in der Folgezeit ohne weitere Nachprüfung übernommen und in allgemeinster Fassung auch auf das gar nicht untersuchte Verhalten pathologischer Menschenseren übertragen worden war, sahen wir uns seinerzeit gezwungen, diesen Vergleich erstmalig durchzuführen. Wir haben dabei gefunden:

1. bei Prüfung des Magnesiumsulfatganzsättigungseffektes (bei Zimmertemperatur) in zwölf Parallelanalysen pathologischer Menschenseren „in keinem Falle genügende Übereinstimmung, dagegen Differenzen bis 50 Proz., in Anbetracht welcher Resultate auf die weitere Fortführung der Reihe verzichtet wurde“;

2. bei Prüfung des Natriumsulfathalbsättigungseffekts (37°), „daß die Fällung ungleichmäßig abläuft, in großer Abhängigkeit von Temperatur und Zeitdauer der Salzeinwirkung zu stehen scheint und fast ausnahmslos um vieles geringere Eiweißmengen zur Abscheidung bringt“.

Aus diesem Ergebnis haben wir den Schluß gezogen, daß „der gleiche Fällungseffekt von Ammonsulfathalb-, Magnesiumsulfatganz- und Natriumsulfathalbsättigung über 34° zum mindesten für pathologische Menschenseren keine allgemeine Geltung besitzt und somit ein Ersatz der Ammonsulfatfällung durch die beiden anderen Salze nicht statthaft erscheint“.

Gegen diese Auffassung wurde, soweit sie sich auf die Magnesiumsulfatwirkung bezieht, bisher unseres Wissens nichts vorgebracht; trotzdem haben wir inzwischen zur eigenen Sicherung denselben Vergleich nochmals an 12 menschlichen Seren durchgeführt, die wie in unserer ersten Untersuchungsreihe von pathologischen Zuständen stammten, bei denen deutliche, wenn auch nicht extreme Veränderungen der zirkulierenden Eiweißkörper des Blutes bestanden.

Die Methodik wurde in der Weise gehandhabt, daß immer je 1 ccm Serum zuerst mit 2 ccm Wasser, hernach mit 3 ccm einerseits einer gesättigten Ammonsulfat-, andererseits einer gesättigten Magnesiumsulfatlösung ver-

---

[1]) Die Gleichwertigkeit der Ammonsulfathalb- mit der Magnesiumsulfatganz- und Natriumsulfathalbsättigung (bei 34°) wurde ursprünglich überhaupt nur aus dem gleichen kompletten Aussalzungseffekte in isolierten Globulinlösungen abgeleitet, während unmittelbare quantitative Vergleichsbestimmungen im Serum selbst unseres Wissens überhaupt nur von *Howe* durchgeführt wurden; seine Analysen beziehen sich auf den Vergleich aller drei Salze in je einem normalen Rind-, Schaf- und Pferdeserum; die mitgeteilten Resultate weichen jedoch bis zu 25 Proz. voneinander ab, und zwar hinsichtlich des Effekts aller drei Salze.

setzt wurde, worauf in letzterer Mischung feinstgepulvertes Salz so lange gelöst wurde, bis ein ungelöster Bodensatz des Salzes resultierte. Nach mindestens 12 Stunden bei Zimmertemperatur erfolgte die Filterung durch härteste Schleicher-Schüll- (Blauband-) Filter mit immer wasserklarem Filtrate, welches schließlich in abgemessener Menge nach Zusatz gleicher Teile m/25 Essigsäure im Wasserbad koaguliert und im Rahmen unserer Wägeanalyse zur Eiweißbestimmung gebracht wurde.

Es ergaben sich folgende Werte:

Ammonsulfathalbsättigung in Grammprozenten:

4,93	5,09	3,63	4,17	4,77	4,33	4,39	4,75	4,50	4,57	4,52	4,63

Magnesiumsulfatganzsättigung in Grammprozenten:

6,17	6,91	4,86	5,15	5,80	4,88	4,88	5,18	4,81	4,58	4,43	4,40

Differenz in Grammprozenten:

2,24	1,82	1,23	0,98	1,03	0,55	0,49	0,43	0,31	0,01	0,09	0,23

Differenz in Prozenten:

45,4	35,7	33,9	23,5	21,6	12,7	11,2	9,0	6,9	0,2	1,9	4,9

Wir fanden also in 12 pathologischen Fällen, deren Ammonsulfatganzsättigungsfraktionen zwischen den absoluten Werten 5,09 und 3,63 g-Proz. lagen, beim Vergleich der Ammonsulfathalb- und Magnesiumsulfatganzsättigung absolute Differenzen bis 2,24 g-Proz. um einen Mittelwert von 0,75 g-Proz., relative Differenzen in Prozenten der Ammonsulfatganzsättigungsfraktion bis 45,4 Proz., und zwar in der Weise, daß einerseits neben großen Differenzen auch gute Übereinstimmung zutage trat, andererseits die Differenzen fast ausschließlich ein Vorzeichen im Sinne eines geringeren Fällungsvermögens der Magnesiumsulfatganzsättigung trugen. Dieses Ergebnis steht also in völligem Einklang mit unseren seinerzeitigen Befunden und erlaubt, abgesehen von seiner Bedeutung für die Methodik, den erneuten Hinweis auf unsere eingangs vertretene Anschauung, daß zum mindesten unter pathologischen Verhältnissen Übergangsfraktionen zwischen den Hauptfraktionen bestehen, die in ihrer Zugehörigkeit unter verschiedenen Bedingungen wechseln können.

Hinsichtlich der Wirkung der Ammonsulfat- und Natriumsulfathalbsättigung wurde bisher von *Arndt* und *Hafner* (l. c.) zu unserer Mitteilung Stellung genommen und die Frage mit Hilfe des Refraktometers im Rahmen der *Robertson*schen Methodik ebenfalls geprüft. Die Autoren gingen von der berechtigten Annahme aus, daß „die Brechungsquotienten der Filtrate nach Abzug der Restrefraktion und der Verdünnungsflüssigkeiten bei Verwendung des gleichen Serums identisch sein müssen" und teilten nur ein Versuchsresultat an einem Kalbsserum mit, in welchem diese Forderung erfüllt wurde, „doch ergaben die Messungen an anderen Tierseren prinzipiell dasselbe Resultat"; *Arndt* und *Hafner* ziehen daraus die Schlußfolgerung, „daß die Natriumsulfataussalzung der Globuline die Ammonsulfatfällung quantatitativ zu ersetzen vermag".

Wir können jedoch diese Schlußfolgerung in dieser allgemeinen Fassung nicht annehmen, da wieder nur normale Tierseren untersucht wurden und uns überdies das beigebrachte zahlenmäßige Material nur *eines* Versuchsergebnisses nicht genügend beweiskräftig erscheint. Uns scheint vielmehr das mitgeteilte Ergebnis einstweilen nur den Schluß zuzulassen, daß in normalen Tierseren, zum mindesten in Einzelfällen Übereinstimmung zwischen den beiden Aussalzungsarten bestehen kann, eine Auffassung, die wir niemals bestritten haben. Wir haben uns inzwischen selbst vielfach wieder mit der Natriumsulfataussalzung aus theoretischen Gründen befaßt, müssen aber bekennen, daß dadurch unsere Anschauung von der technischen Schwierigkeit und Unzuverlässigkeit dieses Verfahrens nur bestärkt wurde; wir sind heute noch nicht einmal soweit, daß wir uns mit Bestimmtheit über die standardisierte Herstellung einer gesättigten Lösung, die untereinander sicher reproduzierbare Aussalzungsresultate gibt, äußern könnten, da die Lösung des Salzes bzw. seine Sättigung nicht nur in ganz außerordentlichem Maße von geringen Temperaturschwankungen abhängig ist, sondern auch zum Auflösungsverfahren in Beziehung steht: es ist beispielsweise nicht gleichgültig, ob man zuerst bei höheren Temperaturen sättigt und nachher bei 37° auskristallisieren läßt, oder ob man nach und nach von niederer Temperatur zu 37° aufsteigt und dabei sukzessiv sättigt. Auf diese Schwierigkeit der Herstellung der standardisierten Salzlösung, von der wir seinerzeit noch gar nichts wußten, wurden wir erst in der letzten Zeit aufmerksam. Wir verzichten daher vorerst auf eine zahlenmäßige Wiedergabe unserer bisherigen Versuchsprotokolle und fassen nur summarisch zusammen, daß wir auch jetzt ebenso wie in unseren früheren Versuchen keine auch nur annähernde Übereinstimmung mit der Ammonsulfatfällung erzielen konnten, und zwar ausnahmslos im Sinne eines geringeren Fällungsvermögens des Natriumsulfats.

Wir möchten dabei ausdrücklich betonen, daß wir uns wie immer reinster Salze (*Merck* pro analysi) bedienten und die Natriumsulfatfällung in der Weise vornahmen, daß 1 ccm Serum zuerst mit 2 ccm Wasser versetzt, hernach auf 37° vorgewärmt, mit gleich warmer, bei dieser Temperatur gesättigter Natriumsulfatlösung vermischt und nach einiger Zeit unter Paraffin filtriert wurde (alles bei 37°).

Als Ursache dieses Ergebnisses möchten wir einstweilen vor allem die wahrscheinliche Ungleichmäßigkeit der gesättigten Natriumsulfatlösung anschuldigen, obwohl es uns sehr wahrscheinlich erscheint, daß auch ein anderer Fällungseffekt als bei der Ammonsulfatfällung in Betracht gezogen werden muß. Jedenfalls geht in methodischer Hinsicht aber schon aus diesen Beobachtungen hervor, daß eine Aussalzungsart, deren exakte Reproduktion auf solche Schwierigkeiten stößt, die Grundlage eines zuverlässig und einfach zu handhabenden quantitativen Verfahrens nicht abgeben kann.

Wir möchten jedoch noch bemerken, daß wir im Begriff sind, die ganze Frage der Aussalzungsverfahren und ihrer Gleichwertigkeit an einem größeren normalen und pathologischen Material menschlicher Herkunft mit einer uns hierfür besonders geeignet erscheinenden Methode, der Nephelometrie, neuerdings zu prüfen. Die Notwendigkeit hierfür scheint uns in der großen Bedeutung gegeben, die einer endgültigen Entscheidung in solcher Hinsicht für die ganze physikalische

Chemie der Eiweißkörper und ihre biologisch-klinische Auswertung zugesprochen werden muß.

Einstweilen aber dürfen wir daran festhalten, daß eine grundsätzliche Übereinstimmung der Magnesiumsulfatganz- und Natriumsulfathalbsättigung mit der Ammonsulfathalbsättigung nicht nur nicht regelmäßig beobachtet wird, sondern zum mindesten bei pathologischem Substrat menschlicher Herkunft anscheinend nur in wenigen Fällen zur Feststellung gelangt.

IV. Die spezifische Refraktion der Eiweißkörpergruppen des Blutplasmas und die Eignung der refraktometrischen Methoden für ihre Maßanalyse.

Wir haben seinerzeit mit Hilfe der Wägeanalyse und refraktometrischen Differenzbestimmung in 15 nativen Blutplasmen zum ersten Male die spezifische Refraktion der Gerinnungsfraktion, des sogenannten Fibrinogens untersucht und sie zwischen $n_D = 0{,}00209$ bis $0{,}00131$ um einen Mittelwert von $n_D = 00169$ bestimmt. Diese Untersuchungen bereiten einige Schwierigkeiten, da die refraktometrische Prüfung nativen Blutplasmas ziemliche technische Anforderungen stellt; dies ist vielleicht auch der Grund, warum unsere Ergebnisse bisher nicht nachgeprüft wurden und solcherweise weder Bestätigung noch Widerspruch erfahren haben. Damit entfiele zwar für uns derzeit die Nötigung, selbst über eine Fortsetzung bzw. Erweiterung unserer damaligen Untersuchungen zu berichten, da wir aber inzwischen aus anderen Gründen diese Bestimmung mehrfach wiederholt haben, möchten wir ihr Ergebnis kurz anführen.

Unsere neue Untersuchungsreihe bezieht sich auf acht menschliche pathologische Blutplasmen; die Methodik wurde in nativem, d. h. von jedem gerinnungsverhindernden Zusatz freiem Substrat in gleicher Weise wie seinerzeit durchgeführt (l. c.). Das Ergebnis ist in folgender Tabelle zusammengestellt:

Refraktion der Gerinnungsfraktion $n_D = 0{,}000\,..$	Wägebestimmung der Gerinnungsfraktion g-Proz.	Spezifische Refraktion $n_D = 0{,}00\ldots$
45	0,23	180
33	0,20	165
48	0,33	144
50	0,39	128
57	0,46	124
74	0,60	123
30	0,27	111
74	0,67	110

Die Betrachtung der Tabelle lehrt, daß unser seinerzeitiges Ergebnis diesem neu erhobenen völlig gleicht, die große Schwankungsbreite der spezifischen Refraktion der Gerinnungsfraktion also als völlig gesichert gelten darf.



Diese großen Schwankungen der spezifischen Refraktion der Gerinnungsfraktion, die wir seinerzeit selbst nicht erwartet hatten, bildeten für uns damals den Anlaß, auch die spezifische Refraktion der Serumeiweißkörpergruppen, die bis dahin auf Grund unzureichender Prüfung als konstant angesehen wurde, neuerdings an einem genügend großen Material menschlicher Herkunft und unter besonderer Berücksichtigung pathologischer Zustände, neuerdings zu bestimmen. Auf die bis dahin vorliegenden Untersuchungen in solcher Richtung von *Reiss*, *Schorer*, *Rohrer*, *Robertson*, *Neuhausen* und *Rioch* brauchen wir hier nicht mehr einzugehen, da ihre eingehende Erörterung bereits in unserer früheren Mitteilung gegeben wurde und wir unseren damaligen Ausführungen nichts hinzuzufügen haben. Wir möchten nur zusammenfassen, daß wir in den Vordergrund unserer Kritik einerseits die geringe Zahl der untersuchten Seren, andererseits die meist tierische Herkunft derselben stellten. Wir selbst bestimmten mit Hilfe unserer gravimetrischen Methode die spezifische Refraktion ausnahmslos in menschlichen Substraten und bevorzugten dabei die Herkunft von pathologischen Zuständen, bei denen möglichst große Abweichungen der physikalisch-chemischen Struktur der zirkulierenden Eiweißkörper erwartet werden konnten. Es wurde bestimmt die spezifische Refraktion:

1. des Gesamtserumeiweißes in 69 Seren;

2. der Ammonsulfathalbsättigungsfraktion in 20 Seren im Lösungsgemisch, in 7 Seren in isolierter Fraktion;

3. der Ammonsulfatganzsättigungsfraktion in 23 Seren im Lösungsgemisch, in 6 Seren in isolierter Fraktion.

Es wurde gefunden eine spezifische Refraktion:

1. des Gesamtserumeiweißes von $n_D = 0{,}00177$ bis $0{,}00258$ um einen Mittelwert von $n_D = 0{,}00196$;

2. der Ammonsulfathalbsättigungsfraktion im Lösungsgemisch von $n_D = 0{,}00126$ bis $0{,}00493$ um einen Mittelwert von $n_D = 0{,}00254$, in isolierter Fraktion von $n_D = 0{,}00214$ bis $0{,}00312$ um einen Mittelwert von $n_D = 0{,}00265$;

3. der Ammonsulfatganzsättigungsfraktion im Lösungsgemisch von $n_D = 0{,}00108$ bis $0{,}00291$ um einen Mittelwert von $n_D = 0{,}00187$, in solierter Fraktion von $n_D = 0{,}00137$ bis $0{,}00204$ um einen Mittelwert von $n_D = 0{,}00166$.

Die mittlere Fehlabweichung der Bestimmung betrug für das Gesamtserumeiweißes $\pm 0{,}00005$, für die Ammonsulfathalbsättigungsfraktion $\pm 0{,}00010$ bei Bestimmung im Lösungsgemisch, $\pm 0{,}00005$ bei Bestimmung in isolierter Fraktion, für die Ammonsulfatganzsättigungsfraktion $\pm 0{,}00006$ bzw. $0{,}00005$.

Aus diesem Ergebnis wurde gefolgert:

1. daß jede einzelne Eiweißkörpergruppe zum mindesten unter pathologischen Bedingungen eingreifenden konstitutiv-chemischen Veränderungen unterliegen muß;

2. daß die refraktometrische Eiweißbestimmung als maßanalytische Methode nicht mehr gelten könne, da ihre Grundlage, die Einheitlichkeit und Konstanz der spezifischen Refraktion, keine allgemeine Geltung



besitzt. Die letztere Schlußfolgerung wurde schließlich durch das Ergebnis ausgedehnter Vergleichsbestimmungen mit Hilfe der Wäge- und Refraktometeranalyse nach *Robertson* (*Berger-Petschacher*) in jeder Hinsicht bestätigt und daher diese Methode sowie das Verfahren von *Reiss* und *Rohrer* abgelehnt.

Zu diesen Ergebnissen, die um des späteren Verständnisses willen kurz zusammengefaßt werden mußten, wurde nun inzwischen einerseits von *Arndt* und *Hafner* (l. c.), andererseits von *Petschacher-Berger* und *Schretter* (l. c.) sowie von *Schretter*[1]) Stellung genommen.

Arndt und *Hafner* sagten: „*W. Starlinger* und *K. Hartl* geben Zahlen für die spezifische Gesamteiweißrefraktion, die, wenn sie zutreffen, nicht nur für die Methodik, sondern auch für Physiologie und Pathologie von hoher Bedeutung sind.“ Die Bestimmung der spezifischen Refraktion des Gesamtserumeiweißes, welche die Autoren zur Nachprüfung durchführten, ergab in 21 menschlichen Seren im Lösungsgemisch n_D = 0,00181 bis 0,00238, „somit eine Variationsbreite von 0,00057 oder rund ein Viertel des Mittelwertes“. Stellt man nun diese Zahlen unseren Zahlen gegenüber, die zwischen n_D = 0,00177 bis 00258 lagen und somit eine Variationsbreite von 0,0079 oder rund zwei Fünftel des Mittelwertes aufwiesen, bedenkt man ferner, daß sich unsere Befunde auf ein dreimal größeres und ausgesucht pathologisches Untersuchungsmaterial beziehen, mithin also bereits nach dem Gesetz der Wahrscheinlichkeit eine größere Ausschlagsschwankung erwarten lassen, so muß man sich fragen, warum *Arndt* und *Hafner* in ihrem Ergebnis nicht nur keine Bestätigung unserer Befunde erblicken, sondern nach einer Erörterung über die „Variabilität als ganz allgemeine Eigenschaft der organisierten Welt“ und über die „Streuung des Corneadurchmessers“, die noch fünfmal größer als die der spezifischen Refraktion des Gesamtserumeiweißes sei, als „praktisches“ Ergebnis feststellen: „daß die refraktometrische Eiweißbestimmungsmethode, wo keine größere Genauigkeit als 0,3 bis 0,5 g-Proz. verlangt wird, in den meisten Fällen weitaus genügend genaue Resultate liefert“; welches „Ergebnis die Ergebnisse von *Berger* und *Petschacher* bestätigt“. Wir müssen gestehen, daß wir dieser Schlußführung nicht folgen können, sondern in den Befunden der beiden Autoren entsprechend der obigen Gegenüberstellung ein grundsätzlich gleiches Ergebnis, wie es unsere eigenen Untersuchungen erbrachten, erblicken, und dieses im Sinne des neuerlichen Nachweises einer großen Schwankungsbreite der spezifischen Refraktion des Gesamtserumeiweißes deuten müssen. Schließlich müssen wir feststellen, daß auch die Bewertung der „praktischen“ Brauchbarkeit mit den eigenen Angaben der Autoren nicht in Einklang gebracht werden kann, da sich wesentlich größere Abweichungen der berechneten Eiweißmengen ergeben, wenn man die Grenzwerte der gefundenen spezifischen Refraktionen zugrunde legt.

Beispiel. Die gefundene Gesamtserumeiweißrefraktion betrage n_D = 0,01500, woraus sich bei Verwendung der *Arndt-Hafner*schen Grenzwerte der spezifischen Refraktion Eiweißwerte von 8,29 und 6,30 g-Proz., bei Verwendung unserer Grenzwerte 8,47 und 5,81 g-Proz., als Differenzen mithin im ersten Falle 1,99, im zweiten Falle 2,66 g-Proz. ergeben, oder

[1]) *Schretter*, diese Zeitschr. 177, 335, 1926.

in Prozenten der beiden Mittelwerte = 7,29 bzw. 7,14 g-Proz. ausgedrückt, rund 27 bzw. 37 Proz. betragen.

Was weiter die spezifische Refraktion der beiden Haupteiweißgruppen allein anlangt, sagen *Arndt* und *Hafner*: „*Starlinger* und *Hartl* haben wohl zum ersten Male bei ihren methodischen Untersuchungen mit vollem Nachdruck auf die Inkonstanz der Brechungsanteile (pro Gramm) der Albumine und Globuline hingewiesen. Und in der Tat scheint dies, soweit uns bis jetzt unser Untersuchungsmaterial ein Urteil hierüber gestattet, der Fall zu sein.“ *Arndt* und *Hafner* fanden mit ihrer Methodik (Natriumsulfatfraktionierung und Stickstoffbestimmung) im Lösungsgemisch als „besonders extreme Werte“ für menschliches Albumin n_D = 0,00148 bis 0,00212, für Globulin n_D = 0,00194 bis 0,00307; bei Tieren ergaben sich noch größere Unterschiede, z. B. beim Rind (die angegebenen Werte sind hier wohl infolge eines Druckfehlers vertauscht ?) für Albumin n_D = 0,00118 (angegeben 0,00287), für Globulin n_D = 0,00287 (angegeben 0,00118). Die Anzahl der Untersuchungen und Mittelwerte sind leider nicht näher angeführt. Es kann also gesagt werden, daß auch hier ein grundsätzlich gleiches Ergebnis wie von uns verzeichnet wurde.

Nach dieser Erörterung der Mitteilung *Arndt* und *Hafners* kommen wir zur Besprechung der Angaben *Petschacher*, *Berger* und *Schretters*, welche Autoren 31 menschliche pathologische Seren und sieben normale Kaninchenseren vergleichend untersuchten und sich dabei der Ammonsulfatfraktionierung und ihrer modifizierten Methode von *Cullen-van Slyke* bedienten. Dabei ergaben sich Werte der spezifischen Refraktion der Ammonsulfatganzsättigungsgruppe von n_D = 0,00174 bis 0,00220 um einen Mittelwert von n_D = 0,00192 beim Menschen, von n_D = 0,00171 bis 0,00198 um einen Mittelwert von n_D = 0,00179 beim Kaninchen, der Ammonsulfathalbsättigungsgruppe von n_D = 0,00171 bis 0,00245 um einen Mittelwert von n_D = 0,00205 beim Menschen, von n_D = 0,00184 bis 0,00226 um einen Mittelwert von n_D = 0,00209 beim Kaninchen. Weiter bestimmten sie bei 15 pathologischen Menschen mit dem zweiten Hilfsprisma die Refraktion unmittelbar in jenem Eiweiß-Ammonsulfatgemisch, welches für die Kjeldahlbestimmung verwendet wurde, und fanden eine spezifische Refraktion des Albumins mit n_D = 0,00168 bis 0,00246 um einen Mittelwert von n_D = 0,00207 und gegensätzlich in 16 pathologischen Fällen, in denen der Eiweißgehalt aus der überstehenden Flüssigkeit, welche bei der Robertsonmethode zur Ermittlung der Albuminrefraktion Verwendung fand, ermittelt wurde, eine solche von n_D = 0,00176 bis 0,00234 um einen Mittelwert von n_D = 0,00176. Das Ergebnis wurde von den Autoren so zusammengefaßt, „daß sich tatsächlich kein einheitliches Verhalten des spezifischen Brechungszuwachses für Albumin und Globulin ergibt“, weiter aber entgegen den oben mitgeteilten klaren experimentellen Befunden, welche wir als grundsätzliche Bestätigung unseres Ergebnisses auffassen dürfen, gefolgert, „daß sich aus den bisherigen Untersuchungen nicht der Nachweis erbringen läßt, ob der spezifische Brechungszuwachs tatsächlich so große Schwankungen aufweist, oder ob dieses Verhalten nur vorgetäuscht wird“, und zwar infolge verschiedener technischer Schwierigkeiten und Bedenken, die im Original nachgelesen werden müssen.

Der Vergleich der von den Autoren mitgeteilten Versuchsanalysen ergab nun im Gegensatz zu unseren früheren Befunden, die entsprechend den großen Schwankungen der spezifischen Refraktion auch große Abweichungen zwischen Gravimetrie und Robertsonmethode ergeben hatten.

zwischen Kjeldahlwerten und *Robertson* trotz der eben wiedergegebenen, mit der gleichen Methode gefundenen großen Streuung der spezifischen Refraktion eine viel kleinere Abweichung. Zusammenfassend beziehen sich die Autoren selbst auf diese „interessante Tatsache", „wieso trotz der auch in ihren Untersuchungen ziemlich weitgehenden Schwankungen des berechneten spezifischen Brechungszuwachses die *Robertson*sche Methode verhältnismäßig gute Resultate ergibt". Wir können demgegenüber nicht auf die Bemerkung verzichten, daß es uns unverständlich scheint, wie eine quantitative Methode, deren Grundlage in der Konstanz eines Umrechnungsfaktors (der spezifischen Refraktion) gegeben ist, nach Angabe der Autoren praktische Resultate mit einer Schwankung von 10 Proz. vermitteln soll, wenn der als konstant angesetzte Umrechnungsfaktor zwischen Zahlen schwankt, die nach Angabe derselben Autoren bis zu 25 Proz., nach Angaben von *Arndt* und *Hafner* bis zu 30 Proz., nach unseren seinerzeitigen Angaben in noch größerem Ausmaße differieren können. Zur experimentellen Beurteilung der Leistungsfähigkeit der Robertsonmethode möchten wir schließlich noch auf eine jüngst erschienene sorgfältige Arbeit von *Schoch*[1]) aus der Klinik *Naegeli* verweisen, derzufolge sich zwischen der Stickstoffbestimmung und Robertsonbestimmung des Gesamteiweißwertes (Stickstoffbestimmungen der Fraktionen wurden leider nicht durchgeführt) Differenzen bis 2,82 g-Proz. beobachten ließen, welche Größenordnung der maximalen Abweichung auch von uns bei Verwendung der Wägeanalyse seinerzeit gefunden wurde.

Schretter schließlich führte die Untersuchungen *Petschacher, Berger* und *Schretters* unter Berücksichtigung der spezifischen Refraktion sowohl des Gesamteiweißes als auch der der beiden Einzelfraktionen weiter, als „Beitrag zu der durch die Arbeiten von *Starlinger* und *Hartl* neuerdings zur Diskussion gestellten und bisher gewiß noch nicht genügend untersuchten Frage nach der Variabilität des spezifischen Brechungszuwachses der Eiweißkörper des Blutserums unter pathologischen Bedingungen". Die spezifische Refraktion des Gesamteiweißgehalts wurde mit der von *Arndt* und *Hafner* in Anwendung gebrachten Methodik an neun pathologischen Menschenseren bestimmt, bei denen eine „stärkere Vermehrung oder Verminderung des Gesamteiweißspiegels oder Hyperglobulinämie nicht nachweisbar war". Es ergaben sich Werte zwischen $n_D = 0{,}00196$ bis 0,00211 um einen Mittelwert von $n_D = 0{,}00202$. Überdies wurden aus der vorausgehenden Arbeit von *Petschacher, Berger* und *Schretter* die dort nicht zusammengestellten spezifischen Refraktion des Gesamteiweißes von 32 pathologischen Menschen übernommen und mit $n_D = 0{,}00183$ bis 0,00215 um einen Mittelwert von $n_D = 0{,}00197$ angegeben, desgleichen aus einer früheren Arbeit *Berger* und *Galehrs*, bei der aus anderen Gründen neben der refraktometrischen auch die Kjeldahlanalyse ausgeführt worden war, die entsprechenden Werte aus einer Reihe von 47 pathologischen Menschenseren berechnet und mit $n_D = 0{,}00179$ bis 0,00228 um einen Mittelwert von $n_D = 0{,}00201$ beziffert. Schließlich wurde auch noch auf frühere Untersuchungen an normalen und pathologischen Kaninchen zurückgegriffen und bei ersteren (7 Fälle) eine Schwankungsbreite von $n_D = 0{,}00184$ bis 0,00201, bei den letzteren (23 Fälle von *Berger* und *Galehr*) eine solche von $n_D = 0{,}00176$ bis 0,00216 nachträglich berechnet.

---

[1]) *A. Schoch*, Schweiz. med. Wochenschr. **42**, 1926.

In Fortsetzung dieser Untersuchungen an den gleichen neun Seren wurde die spezifische Refraktion der Halb- und Ganzsättigungsfraktion bestimmt, und zwar einerseits in isolierter Fraktion mit $n_D = 0{,}00172$ bis $0{,}00212$ für Albumin, mit $n_D = 0{,}00188$ bis $0{,}00234$ für Globulin[1]) andererseits im Lösungsgemisch mit $n_D = 0{,}00156$ bis $0{,}00229$ für Albumin, mit $n_D = 0{,}00174$ bis $0{,}00360$ für Globulin[2]). Aus diesen Befunden wird nun nach Erörterung aller nur möglichen technischen Fehlerquellen, welche die gefundenen Schwankungen irgendwie verkleinern könnten[3]), gefolgert, daß „trotzdem Schwankungen übrigbleiben, die man als reelle Unterschiede bezeichnen" könne. Statt aber nun in Anbetracht dieser trotz des kleinen und nicht extrem pathologischen Materials gefundenen großen Differenzen, die unsere Befunde grundsätzlich bestätigen, dieses rückhaltslos zuzugeben, wird in der weiteren Erörterung immer wieder auf die große technische Fehlermöglichkeit hingewiesen, die vielleicht doch die ganze Schwankungsbreite erklären könnte, trotzdem kurz vorher diese Möglichkeit unbedingt vom Autor selbst zahlenmäßig ausgeschlossen werden konnte. Und schließlich wird auf Grund der Näherung der Mittelwerte, die von allen Autoren, auch von uns gefunden worden war, für die vorliegende Fragestellung aber verständlicherweise gar nichts besagt, das Ergebnis in der Weise resümiert, daß die erhobenen Befunde „in methodischer Hinsicht gegenüber *Starlinger* und *Hartl* die Grundlagen der *Robertson*schen Methode und die Angaben von *Berger* und *Petschacher*, *Arndt* und *Hafner*, *Petschacher*, *Berger* und *Schretter* über die Brauchbarkeit dieser Methode bestätigen". Einer solchen Schlußführung können wir nichts erwidern.

Zusammenfassend glauben wir also auf Grund dieser Gegenüberstellung der von uns und den nachprüfenden Autoren gefundenen

---

[1]) Die in „eingeengten" und „nicht eingeengten" Lösungen erhaltenen Resultate wurden von uns zusammengezogen und die Extremwerte einander gegenübergestellt.

[2]) Wobei die eben angeführten Extremwerte mit aufgenommen wurden, von denen der Autor sagt, „es dürften wohl Fehlbestimmungen vorliegen", mit der Begründung, diese Werte wären „abnorm hoch bzw. abnorm niedrig", dabei aber ausdrücklich angibt, „über den Mechanismus dieser Fehlbestimmungen vorderhand nichts Bestimmtes aussagen zu können". Die Tatsache allein, daß diese Werte aus der Reihe der anderen Bestimmungen, deren Zahl ja nur sieben betrug, „herausfallen", scheint uns aber nicht genügend zu begründen, regelrecht erhobene Befunde zu vernachlässigen, denn unter solchen Bedingungen hätten wir in unserer seinerzeitigen Untersuchungsreihe einige unserer Werte, die uns ebenfalls recht hoch erschienen, und die von den hier angeführten Autoren mit (!) bezeichnet werden, ebenfalls als Fehlbestimmung auffassen dürfen. Wir haben daher auch die hohen Werte *Schretters* angeführt.

[3]) Dazu möchten wir nebenbei bemerken, daß, wenn die technischen Fehlerquellen in der Tat ein solches Ausmaß erlangen, daß sie Schwankungsbreiten der spezifischen Refraktion obenerwähnter Größenordnung bedingen, was wir allerdings unbedingt ablehnen müssen, in diesem Falle alle refraktometrischen Verfahren verständlicherweise von vornherein gerichtet wären. Denn die gleichen Fehlerquellen kommen verständlicherweise auch für das einfache Maßverfahren auf refraktometrischer Grundlage in Betracht.



Resultate sagen zu dürfen, daß unsere Angaben, soweit sie sich auf die experimentellen Daten beziehen, grundsätzliche Bestätigung erfahren haben. Mit den von manchen Autoren aus diesen experimentellen Befunden gezogenen Schlüssen aber können wir uns nicht auseinandersetzen, da sie diesen Befunden nach den allgemeinen Gesetzen der Schlußführung nicht entsprechen.

Trotzdem wir also an sich keine Veranlassung hätten, unsere seinerzeitigen Untersuchungen selbst nochmals zu wiederholen, haben wir uns dazu doch entschlossen, und zwar aus folgendem Grunde: es ist uns bei Betrachtung aller bisherigen Ergebnisse aufgefallen, daß die größten Schwankungen von den Autoren beobachtet wurden, die mit Substraten arbeiteten, welche von möglichst schweren pathologischen Zuständen stammten. Wir haben uns daher die Frage vorgelegt, ob wir nicht vielleicht selbst bei einem ausgesuchten gegenteiligen Material eine wesentlich geringere Schwankungsbreite feststellen würden, und haben in solchem Sinne die nachfolgenden Untersuchungen an 39 menschlichen Seren durchgeführt, die von Zuständen stammten, bei denen schwerere Veränderungen der zirkulierenden Eiweißkörper nicht angenommen werden konnten.

Die Bestimmung erfolgte im Lösungsgemisch im Rahmen der seinerzeit eingehaltenen Methodik[1]), jedoch fast ausschließlich in Doppelbestimmungen in dem Sinne, daß nicht nur die Refraktion der verdünnten Ammonsulfatlösung und des verdünnten Serum-Ammonsulfatgemisches zweimal bestimmt, sondern das ganze Lösungsgemisch jeweils doppelt angesetzt wurde. Auf die Doppelbestimmung des Vollserums und der Restrefraktion haben wir verzichtet, weil bei ihr Abweichungen außerordentlich gering sind, jedenfalls das Endresultat nicht merkbar beeinflussen können, wie wir schon seinerzeit experimentell nachweisen konnten.

Die Differenzen der viertelgesättigten Ammonsulfatverdünnungen betrugen in 20 Fällen (nur 20, weil wir an jedem Tage zwei Seren gleichzeitig untersuchten und dadurch eine Doppelbestimmung ersparten) viermal 0,0, neunmal 0,1, sechsmal 0,2, einmal 2,2 Skalenteile.

Die Differenzen der verdünnten zentrifugierten Ammonsulfat-Serummischungen betrugen bei absoluten Grenzwerten zwischen 71,9 und 78,5 Skalenteilen in 38 Fällen: 0,0, zwanzigmal 0,1, elfmal 0,2, fünfmal 0,3, einmal 0,5 Skalenteile.

Ebenso wurden auch alle gravimetrischen Eiweißbestimmungen in Doppelanalysen mit dem Ergebnis der von uns vertretenen Fehlergröße ausgeführt.

Das Resultat ist in folgender Tabelle zusammengestellt.

[1]) Diese Zeitschr. **160**, 130, 1925.

Nr.	Refraktion						Spezifische Refraktion		
	Gesamteiweiß	A. H. F.	A. G. F.	Gesamteiweiß	A. H. F.	A. G. F.	Gesamteiweiß	A. H. F.	A. G. F.
	n_D = 0,0 ...			g-Proz.	g-Proz.	g-Proz.	n_D = 0,00 . .		
1	1291	0381	0910	7,08	1,98	5,10	182	192	179
		0381	0910	7,03	2,00	5,03	184	191	181
2	1443	0497	0946	7,63	2,40	5,23	189	207	185
		0457	0986	7,48	2,30	5,18	192	199	184
3	1269	0181	1088	6,53	0,83	5,70	194	218	191
		0161	1108	6,60	0,70	5,90	192	230	186
4	1582	0692	0890	8,25	3,50	4,75	192	198	187
		0610	0972	8,13	3,13	5,00	197	195	194
5	1414	0556	0858	7,60	2,90	4,70	186	192	183
		0568	0846	7,78	3,00	4,78	182	189	177
6	1190	0660	0530	6,28	3,28	3,00	190	201	177
		0644	0546	6,55	3,30	3,25	182	195	166
7	1044	0474	0570	5,55	2,30	3,25	188	206	175
		0502	0542	5,48	2,38	3,10	192	211	175
8	1323	0361	0962	7,30	1,58	5,72	181	228	168
		0333	0990	7,43	1,53	5,90	178	218	168
9	1175	0233	0944	6,13	1,13	5,00	192	206	189
		0183	0992	6,00	0,87	5,13	196	210	193
10	1449	0682	0767	7,58	4,00	3,58	192	170	214
		0731	0718	7,40	3,82	3,58	196	191	201
11	1338	0770	0568	7,03	4,03	3,00	190	191	189
12	1237	0801	0436	6,85	3,80	3,05	181	211	143
		0810	0424	6,93	4,00	2,93	179	203	144
13	1223	0573	0650	6,35	2,95	3,40	192	194	191
		0585	0638	6,25	2,72	3,53	195	201	181
14	1261	0231	1030	5,93	1,00	4,93	229	231	209
		0203	1058	5,78	0,90	4,08	219	226	217
15	1233	0283	0950	6,70	1,45	5,25	184	195	182
		0267	0966	6,68	1,38	5,30	184	193	182
16	1294	0264	1030	6,93	1,23	5,70	187	214	181
		0236	1058	6,90	1,12	5,78	188	211	183
17	1468	0282	1186	7,75	1,43	6,32	189	197	188
		0298	1170	7,83	1,53	6,30	187	195	186
18	1354	0734	0620	6,58	3,50	3,08	206	210	201
		0750	0604	6,75	3,65	3,10	201	205	195
19	1384	0656	0728	7,30	3,00	4,30	190	219	169
		0684	0700	7,23	3,03	4,20	191	226	167
20	1654	0348	1306	8,45	1,70	6,75	196	205	193
		0392	1262	8,42	1,89	6,53	196	207	193
21	1559	0283	1276	7,63	1,33	6,30	204	213	202
		0309	1250	7,70	1,36	6,35	202	228	197
22	1610	0372	1238	8,48	1,90	6,58	189	196	188
		0404	1206	8,60	2,07	6,53	188	195	184
23	1422	0374	1048	7,70	1,87	5,83	185	200	179
		0398	1024	7,75	2,05	5,70	183	194	180
24	1232	0586	0646	6,20	3,18	3,02	199	203	184
		0602	0630	6,45	3,20	3,25	191	194	188

Nr.	Refraktion Gesamteiweiß	A. H. F.	A. G. F.	Gesamteiweiß	A. H. F.	A. G. F.	Spezifische Refraktion Gesamteiweiß	A. H. F.	A. G. F.
	$n_D = 0{,}0\ldots$			g-Proz.	g-Proz.	g-Proz.	$n_D = 0{,}00\ldots$		
25	1463	0403	1060	7,50	2,02	5,48	195	199	194
		0375	1088	7,63	2,93	5,70	192	194	191
26	1516	0900	0616	7,68	4,50	3,18	197	200	194
		0928	0588	7,83	4,73	3,10	193	198	189
27	1619	0427	1192	8,58	2,10	6,48	189	203	184
		0439	1180	8,63	2,23	6,40	187	197	184
28	1501	0711	0790	7,65	3,55	4,10	196	203	193
		0699	0802	7,78	3,50	4,28	193	200	187
29	1501	0747	0754	7,45	3,67	3,78	301	203	199
		0733	0766	7,53	3,63	3,90	199	202	196
30	1285	0597	0688	6,90	3,07	3,83	186	188	179
		0609	0676	6,78	3,10	3,68	189	196	184
31	1231	0323	0918	6,60	1,47	5,13	187	219	179
		0297	0934	6,63	1,43	5,20	186	208	179
32	1489	0233	1266	7,90	1,10	6,80	186	212	186
		0238	1250	7,78	1,08	6,70	191	220	187
33	1437	0707	0730	7,68	3,70	3,98	187	191	183
		0695	0742	7,80	3,72	4,08	184	187	182
34	1502	0634	0868	8,08	3,28	4,80	196	194	181
		0666	0836	8,00	3,37	4,63	188	198	180
35	1524	0440	1084	8,03	4,35	5,68	189	188	191
		0428	1096	8,15	2,25	5,90	187	190	186
36	1521	0383	1138	8,43	1,93	6,50	180	198	175
		0399	1122	8,50	2,02	6,48	178	198	173
37	1532	0484	1048	8,70	2,20	6,50	176	220	161
		0500	1032	8,63	2,23	6,40	177	224	161
38	1470	0356	1114	7,78	1,78	6,00	189	200	186
		0340	1130	7,80	1,72	6,08	188	198	186
39	1464	0394	1070	7,70	1,87	5,83	190	211	184
		0387	1086	7,48	1,78	5,70	196	212	191

Es wurden also bei 39 (darunter 38 vollständigen Doppel-) Bestimmungen folgende Einzelmittelwerte der spezifischen Refraktion gefunden:

Für das Gesamteiweiß $n_D = 0{,}00\ldots$

224	203,5	203	200	196	195	195	194,5	194	194
193,5	193,5	193,5	193	193	191	191	190	189,5	194
193,5	193,5	193,5	193	193	191	191	190	189,5	188,5
188,5	188,5	188	188	188	187,5	187,5	187	186,5	186
185,5	184	184	184	183	180	179,5	179	176,5	

um einen Gesamtmittelwert von 190,6.

Für die Halbsättigungsfraktion $n_D = 0{,}00\ldots$

228,5	227,5	222,5	222	220	216	215	213,5	212,5	211
208	208	207,5	206,5	206	203	202,5	201,5	200	199
199	199,5	198	198	197,5	197	196,5	196,5	196	196
195,5	194	192	191,5	191	190,5	189	189	190,5	

um einen Gesamtmittelwert von 195,4.

Für die Ganzsättigungsfraktion $n_D = 0{,}00\ldots$

213	207,5	199,5	198	197,5	193	192,5	191,5	191,5	191
190	190	189,5	189	188,5	187,5	187	186,5	186,5	186
186	184	182,5	182	182	181,5	180,5	179,5	179,5	179
179	175	174,5	174	168	168	161	143,5		

um einen Gesamtmittelwert von 182,5.

Die Ausschlagsbreite betrug für das Gesamteiweiß $n_D = 0{,}00047$, entsprechend 25 Proz. des Gesamtmittelwertes, für die Halbsättigungsfraktion $n_D = 0{,}00048$, entsprechend 25 Proz. des Gesamtmittelwertes, für die Ganzsättigungsfraktion $n_D = 0{,}00069{,}5$, entsprechend 38 Proz. des Gesamtmittelwertes.

Die spezifische Refraktion der Halbsättigungsfraktion lag mit einer einzigen Ausnahme (Protokoll Nr. 10) immer höher als die der Ganzsättigungsfraktion, die des Gesamteiweißes immer in der Mitte zwischen beiden.

Die $\pm$-Abweichung der 38 Doppelbestimmungen erreichte:

für das Gesamteiweiß $n_D = 0{,}0000$
5; zweimal 4; 3; 2,5; fünfmal 2; neunmal 1,5; vierzehnmal 1; zweimal 0,5; 0; im Mittel $\pm$ 0,00001,6;

für die Halbsättigungsfraktion $n_D = 0{,}000$
10,5; 7,5; 5,5; 5; 4,5; dreimal 4; 3,5; 3; fünfmal 2,5; 2; viermal 1,5; fünfmal 1; viermal 0,5; 0; im Mittel $\pm$ 0,00002,7;

für die Ganzsättigungsfraktion $n_D = 0{,}0000$
6,5; 5,5; 4; dreimal 3,5; 3; viermal 2,5; dreimal 2; viermal 1,5; fünfmal 1, 0,5; achtmal 0; im Mittel $\pm$ 0,00001,7.

Die Durchführung der Bestimmung darf demnach als sehr gut bezeichnet und die Genauigkeit der angeführten Einzelmittelwerte dementsprechend hoch eingeschätzt werden.

Vergleichen wir nun diese Werte, die in wenig oder nicht pathologischen Seren gefunden wurden, einerseits mit unseren früheren, an meist extrem pathologischen Seren erhobenen Befunden, andererseits mit den Angaben der anderen Autoren, die im vorstehenden referiert wurden, so dürfen wir zusammenfassend sagen: daß wir in dieser neuen Reihe entsprechend unseren Erwartungen zwar bedeutend ge-

ringere Schwankungen der spezifischen Refraktion sowohl des Gesamteiweißes, als auch der einzelnen Fraktionen feststellen konnten, als in unserer seinerzeitigen Untersuchungsserie, daß aber auch im vorliegenden Material sich noch sehr große Schwankungen ergaben, die mindestens ein Viertel des Gesamtmittelwertes betrugen; weiter, daß die Größenordnung unserer nunmehrigen Werte weitgehend mit derjenigen, die von den genannten Autoren festgestellt wurde, zur Deckung gelangt, wie ja auch die beiderseitigen Untersuchungssubstrate qualitativ einander ähneln, indem sie unter Vermeidung schwer pathologischer Seren zusammengestellt wurden.

Wir dürfen daher berechtigterweise feststellen, daß unsere seinerzeit vertretene Anschauung über die Inkonstanz der spezifischen Refraktion der zirkulierenden Eiweißkörper des Blutplasmas sowohl in ihrer Gesamtheit wie in den einzelnen Fraktionen uneingeschränkt zu Recht besteht, daß die Größe der jeweils gefundenen Ausschlagsbreite zwar von dem Ausmaß der pathologischen Strukturänderung abzuhängen scheint, jedoch auch bei normalen und kaum veränderten Seren bereits so groß ist, daß die Einführung einer willkürlich gewählten einheitlich-konstanten spezifischen Refraktion als Grundlage maßanalytischer refraktometrischer Verfahren nicht statthaft erscheint. Daraus aber folgt weiter, daß unsere seinerzeitige Auffassung über den Wert bzw. Unwert aller derartigen Methoden (*Reiss*, *Rohrer*, *Robertson*) unveränderte Geltung besitzt, alle diese Verfahren also nicht als maßanalytische Verfahren, sondern höchstens als Schätzungsverfahren zur Eiweißbestimmung bezeichnet werden dürfen.

V. Anhang über die vergleichende Viskositätsuntersuchung des Blutserums.

Nachdem in den vorausgegangenen Abschnitten die eingangs gegebenen Fragestellungen der entsprechenden theoretischen und experimentellen Kritik unterworfen wurden, möchten wir im folgenden anhangsweise noch einige Bemerkungen über die vergleichende Viskositätsuntersuchung des menschlichen Blutserums anfügen, da diese Frage mit den vorstehend behandelten Ergebnissen in engem Zusammenhang steht und überdies zu unserer seinerzeitigen Mitteilung (l. c.) von den gleichen Autoren, die in den früheren Abschnitten referiert wurden, Bemerkungen veröffentlicht wurden, die wir kurz beantworten möchten.

Auf die kombinierte Viskosirefraktometrie *Naegeli-Rohrers*, die ursprünglich ebenfalls als maßanalytisches Verfahren mitgeteilt wurde, brauchen wir nicht mehr einzugehen, da das Verfahren in diesem Sinne heute wohl kaum mehr Verwendung findet und von niemandem verteidigt wird, so daß unsere seinerzeitige, durch entsprechende maßanalytische Belege gestützte unbedingte Ablehnung dieses Verfahrens nicht neuerdings begründet werden muß.

Wir brauchen uns daher nur mit den Methoden zu beschäftigen, welche die Viskositätsprüfung als selbständiges Verfahren üben. Wir haben seiner-



zeit in einer zusammenfassenden vergleichenden Prüfung und Kritik aller hierher gehörigen Methoden die Meinung vertreten, daß es vorteilhaft wäre, die verwirrende Vielheit dieser Verfahren und ihrer Bezeichnungen zweckmäßig zu vereinfachen, indem wir vorschlugen, einerseits solche Verfahren, die auf prinzipiell gleicher Grundlage und Ergebnisbewertung beruhen, zusammenzuziehen, andererseits solche, denen nachweislich schwere methodische Mängel anhaften, überhaupt fallen zu lassen. Wir haben schließlich nach entsprechender theoretischer und experimenteller Begründung als zweckmäßigsten Ausdruck eine Kombination der Prinzipe von *Hellwig-Neuschloss*[1]) (Viskositätsfaktor) und *E. A. Hafner*[2]) (Zustandsviskosität) vorgeschlagen und die Verwendung der maßanalytisch in sorgfältiger Weise von *Hellwig-Neuschloss* angegebenen Vergleichstabellen für Normalserum, sowie der maßanalytischen Eiweißbestimmung unter Ausschluß der Refraktometrie verlangt; der Ausdruck wird gewonnen durch die Differenz zwischen Gesamtviskosität des untersuchten Serums und Viskosität des enteiweißten Serums (welche praktisch mit 1,02, in Ausnahmefällen mit bis 1,04 beziffert werden kann), gebrochen durch die Differenz zwischen Gesamtviskosität des eiweißgleichkonzentrierten Normalserums (welche aus den Tabellen von *Hellwig* und *Neuschloss* abgelesen wird) und 1,02. Für diesen Ausdruck haben wir als möglichst unpräjudizierliche Bezeichnung „relative Viskosität" vorgeschlagen, da die bereits vorliegenden Bezeichnungen einerseits dem Ausdruck nicht entsprachen und auch sonst verschiedenen Einwendungen zugänglich erschienen, andererseits bei Wiederverwendung für einen neuen zugrunde liegenden Begriff die bereits bestehende Wirrnis nur vermehrt hätten. Neben diesem typischen Ausdruck haben wir jedoch noch folgende Ausdrücke als selbständige Begriffe belassen (Viskositäts-Refraktionsquotient, reduzierte Viskosität nach *Rusczniak*, Viskositätskonzentrationsquotient nach *Hafner* bzw. *Petschacher*), jedoch gleichzeitig verschiedene methodische Mängel betont. Schließlich haben wir durch die vergleichende Untersuchung von 39 normalen und pathologischen Seren nachgewiesen, daß „die Verwendung der relativen Viskosität als für den biologisch-klinischen Zweck bestgeeignet bezeichnet werden darf, da sie die Veränderung der Eiweißkörper und nur dieser in größten Ausschlägen darzustellen vermag".

Zu diesen Ausführungen wurde nun einerseits von *Hafner*[3]), andererseits von *Petschacher*[4]) in folgender Weise Stellung genommen.

Hafner führte aus:

1. daß zwar die Reduktion der Begriffe und Namen auch ihm erwünscht scheine, unsere „Identifikationsbestrebungen" aber als „verfrüht" bezeichnet werden müßten, da das „ganze Gebiet noch so wenig abgeklärt und die Leistungsfähigkeit der verschiedenen Ausdrücke noch ganz unabgegrenzt" sei. Zum Beweis führte er zwei Fälle an, bei denen die Nebeneinanderstellung des Viskositäts-Konzentrationsquotienten, der spezifischen Viskosität, der spezifischen Viskositätserhöhung und der Zustandsviskosität ergibt, daß die jeweilige Differenz der zwei Werte bei den verschiedenen Ausdrücken verschieden groß ist;

---

[1]) *Hellwig-Neuschloss*, Klin. Wochenschr. **40, 1922.**
[2]) *Hafner*, ebendaselbst 5, 1925.
[3]) *Derselbe*, diese Zeitschr. **165**, 29, 1925.
[4]) *Petschacher*, Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **50, 1926.**

2. bemerkt er, daß unsere Bezeichnung „überflüssig" und außerdem „zu verwerfen" sei, da „relative Viskosität physikalisch-chemisch die Viskosität bezogen auf die des Wassers als Einheit" bedeute und eine „Doppelspurigkeit der Namengebung" in diesem Grenzgebiet der physikalischen Chemie und Biologie tunlichst vermieden werden sollte.

Petschacher schloß sich diesen Ausführungen an und nahm außerdem gegen unsere Ablehnung der Refraktometrie als nicht genügend zuverlässiger Methode zur Eiweißkonzentrationsbestimmung Stellung, da sie nach den neuesten Untersuchungen *Petschachers*, *Bergers* und *Schretters* genügende Leistungsfähigkeit aufweise.

Demgegenüber möchten wir kurz zusammenfassen:

Zu 1. Da wir eben der Meinung waren, die Reduktionsbestrebungen wären einer weiteren Verständigung nur dienlich, haben wir die Zeit dazu für gekommen erachtet; daß die relativen Differenzen zwischen verschiedenen Seren bei Prüfung mit den vorliegenden hierher gehörigen Verfahren verschiedene absolute Werte darstellen, haben wir nicht nur niemals übersehen oder bestritten, sondern eben durch unseren experimentellen Vergleich an einem 20mal größeren Material als demjenigen *Hafners* nachgewiesen, weiter aber aus dem Ergebnis der gleichen Reihe abgeleitet, daß dem vorhin ausgeführten Begriffe die derzeit beste Eignung zur Feststellung von Strukturänderungen der Eiweißkörper zukomme; weshalb wir ihn eben den anderen vorzogen.

Zu 2. Was den Einwand gegen unsere vorgeschlagene Namensgebung anlangt, müssen wir *Hafner* Recht geben, daß eine solche Doppelspurigkeit der Begriffe tatsächlich neue Mißverständnisse schaffen könnte, was wir gerade vermeiden wollten. Andererseits aber können wir unsere seinerzeitigen Bedenken gegen die Bezeichnung „Zustandsviskosität" nicht aufgeben und möchten wieder zu einer ganz unpräjudizierlichen Namengebung raten, etwa zu „Vergleichsviskosität".

Petschacher können wir nur erwidern, daß wir entsprechend unseren seinerzeitigen und neueren Experimentalergebnissen über die Inkonstanz der spezifischen Refraktion, die in prinzipiell gleicher Weise auch von ihm selbst, sowie von *Arndt* und *Hafner* bestätigt werden mußten (siehe die vorausgehenden Abschnitte), unsere unbedingte Ablehnung der Refraktometrie als maßanalytischer Methode zur Bestimmung der Eiweißkörper aufrecht erhalten müssen und daher auch unsere Meinung über seine Methoden der vergleichenden Viskositätsprüfung des Serums, die auf der refraktometrischen Eiweißbestimmung beruhen, nicht ändern können.

Zusammenfassung.

1. Die theoretisch erhobenen, experimentell nicht gestützten Einwände *Arndt-Hafners*, sowie *Petschacher-Berger-Schretters* gegen die vereinfachte Wägeanalyse werden erörtert und auf Grund entsprechender experimenteller Ergebnisse abgelehnt.

In Bestätigung des Ergebnisses der seinerzeit von uns erhobenen, mit Hilfe der vereinfachten Wägeanalyse durchgeführten je 65 Doppelbestimmungen des Gesamtserumeiweißes und der Ammonsulfatganzsättigungsfraktion, welche eine mittlere ±-Abweichung für ersteres von ± 0,12 g-Proz., für letztere von ± 0,10 g-Proz. ergeben hatten,

wird eine neuerliche Vergleichsserie mitgeteilt, die in 82 Doppelbestimmungen des Gesamtserumeiweißes und in 75 ebensolchen der Ganzsättigungsfraktion eine $\pm$-Abweichung von je 0,06 g-Proz. ergibt. Diese methodische Genauigkeit, welche von *Petschacher-Berger-Schretter* auf Grund eines zahlenmäßig nicht ausgeführten Ergebnisses von sieben Analysen in Zweifel gezogen wurde, darf also auf Grund unseres 20 mal größeren Beobachtungsmaterials als völlig gesichert gelten. Da weiter die technische Handlichkeit der vereinfachten Wägeanalyse diejenige der hinsichtlich Zuverlässigkeit gleichzuwertenden Stickstoffbestimmung weitaus übertrifft, darf das erstere Verfahren nach wie vor als Methode der Wahl für den biologisch-klinischen Serienversuch angesehen werden, zudem die Genauigkeit, die für diesen erfordert werden muß, hinter der nachgewiesenen Zuverlässigkeit des Wägeverfahrens wesentlich zurückbleibt.

2. Der seinerzeit an 12 pathologischen Seren erbrachte Nachweis, daß die bis dahin allgemein angenommene, niemals jedoch genügend geprüfte quantitative Übereinstimmung der Ammonsulfathalb- und Magnesiumsulfatganzsättigung zum mindesten im pathologischen Substrat keine regelmäßige Geltung besitzt, wurde durch das Ergebnis einer neuen Untersuchungsreihe am gleichen Material bestätigt: es ergaben sich bei der vergleichenden gravimetrischen Prüfung von 12 Seren neben mehr oder weniger genügenden Näherungsresultaten Differenzen, die bis 45 Proz. der Ammonsulfatganzsättigungsfraktion erreichten. In gleicher Weise wurde auch der Fällungseffekt der Ammonsulfathalb- mit der Natriumsulfathalbsättigung bei 37° in pathologischen Menschenseren neuerdings verglichen, ohne daß jedoch eine sichere Entscheidung erzielt werden konnte, da es bisher nicht gelang, eine völlig reproduzierbare Natriumhalbsättigungsfällung zu gewährleisten. In den bisher erfolgten Parallelanalysen konnte jedenfalls eine genügende Übereinstimmung der beiden Fällungsverfahren ebenso wie in der seinerzeitigen Untersuchungsreihe nicht beobachtet werden. Unsere damals vertretene Anschauung, daß die Ammonsulfathalbsättigung daher zum mindesten im pathologischen menschlichen Substrat den beiden anderen Fällungsverfahren nicht ohne weiteres gleichgeordnet werden kann, darf daher in vollem Umfang aufrechterhalten bleiben.

3. Es wird auf die Inkongruenz hingewiesen, die zwischen den experimentellen Befunden und den daraus abgeleiteten Schlußfolgerungen *Arndt-Hafners*, *Petschacher-Berger-Schretters* und *Schretters* insofern besteht, als diese Autoren in Nachprüfung unserer seinerzeitigen Angaben über die große Schwankungsbreite der spezifischen Refraktion der Eiweißkörpergruppen des Blutplasmas, welche bis dahin als konstant angesehen wurde, zwar einerseits ebenfalls große Schwankungen dieser

Größe fanden, andererseits aber gegen unsere aus diesen Befunden abgeleitete (und überdies noch durch entsprechende Vergleichsanalysen gestützte) unbedingte Ablehnung aller refraktometrischen Methoden Stellung nahmen.

Es wird an einer neuen Versuchsreihe, die im Gegensatz zu unserer früheren, welche meist extrem pathologische Seren betraf, aus 39 meist normalen Menschenseren bestand, den Erwartungen entsprechend gezeigt, daß die Schwankungsbreite in Seren, deren Eiweißstruktur keine schweren Veränderungen aufweist, zwar beträchtlich kleiner ist, immerhin aber noch mindestens ein Viertel des Gesamtmittelwertes beträgt (für das Serumgesamteiweiß zwischen $n_D = 0{,}00176$ bis 0,00224, für die Halbsättigungsfraktion zwischen $n_D = 0{,}00190$ bis 0,00228, für die Ganzsättigungsfraktion zwischen $n_D = 0{,}00143$ bis 0,00213). Da nun eine Methode, die auf der Konstanz eines prinzipiellen Umrechnungsfaktors aufgebaut ist, als maßanalytische Methode nicht mehr gelten kann, falls dieser willkürlich konstant gesetzte Faktor selbst unter normalen Bedingungen bis zu 25 Proz. schwankt, unter pathologischen Bedingungen aber noch viel größere Ausschläge aufweist, bleibt unsere unbedingte Ablehnung aller refraktometrischen Verfahren zur quantitativen Eiweißbestimmung in vollem Umfang aufrecht.

Gleichzeitig wird in einer neuerlichen Untersuchungsreihe von acht nativen pathologischen Menschenplasmen die Schwankungsbreite der spezifischen Refraktion auch der Gerinnungsfraktion im vollen Ausmaß der eigenen früheren Ergebnisse bestätigt ($n_D = 0{,}00110$ bis 0,00180).

4. Es werden anhangsweise einige theoretische Bemerkungen *Hafners* sowie *Petschachers* über unsere vorausgehende zusammenfassende experimentelle Kritik der verschiedenen Methoden zur vergleichenden Viskositätsuntersuchung des Serums kurz erörtert.

Der Einfluß verschiedener Präparate der Chiningruppe auf die fermentativen Funktionen des Organismus.

VII. Mitteilung[1]):

Die Bedeutung der aktuellen Reaktion des Milieus bei der Erforschung der fermentativen Prozesse.

Von

J. A. Smorodinzew und **A. N. Adowa.**

(Aus der chemo-therapeutischen Abteilung des Tropeninstituts des Volkskommissariats für Gesundheitswesen in Moskau.)

(Eingegangen am 13. Januar 1927.)

I.

Während bei der Pepsinverdauung der Zusatz von Chinin-[2]), Arsen- und Antimonpräparaten[3]) die Reaktion des Milieus nicht verändert, verschieben einige der geprüften Verbindungen das p_H in den Versuchen mit Lipase[4]) und Trypsin manchmal sehr stark und verändern bedeutend den Reaktionsverlauf.

In der vorigen Mitteilung[5]) stellten wir fest, daß 1. das salzsaure und schwefelsaure Chinin in den Konzentrationen 0,009 bis 0,451 Proz., die Doppelverbindung des Chinins mit dem Harnstoff bei 0,005 bis 0,036 Proz. und die Harnstoffsalze bei 0,002 bis 0,019 Proz. die Trypsinverdauung des Caseins verlangsamen; 2. die Harnstoffsalze bei 0,019 Proz. und die Doppelverbindung des Chinins mit Harnstoff bei 0,36 Proz. den Prozeß beschleunigen und 3. der freie Harnstoff bei 0,075 Proz. wie auch seine Salze und die Chininsalze in den kleinsten Konzentrationen keine Wirkung auf die Trypsinverdauung des Caseins ausüben.

Um die Gewißheit zu bekommen, daß die beschriebenen Veränderungen des Verlaufs der Trypsinverdauung des Caseins durch

---

[1]) VI. Mitteilung, *J. A. Smorodinzew* und *V. A. Danilow*, diese Zeitschr. 181, 149, 1927.

[2]) *J. A. Smorodinzew* und *C. S. Lemberg*, ebendaselbst **162**, 266, 1925.

[3]) *J. A. Smorodinzew* und *N. P. Riabouschinsky*, ebendaselbst **168**, 73, 1926.

[4]) *J. A. Smorodinzew* und *V. A. Danilow*, ebendaselbst **181**, 157, 1927.

[5]) *J. A. Smorodinzew* und *A. N. Adowa*, ebendaselbst **185**, 128, 1923.

die direkte Einwirkung der angewandten Stoffe bedingt sind, war es nötig, den Einfluß der aktuellen Reaktion des Milieus festzustellen. Leider waren wir dann nicht im Besitz der für die Bestimmung des p_H-Wertes nötigen Apparatur und Reaktive[1]); jetzt sind wir imstande, die betreffenden Korrekturen in unsere Arbeiten einzutragen.

II. Die Bestimmung der aktuellen Reaktion in chininhaltigen Lösungen.

Da Chinin die Wasserstoffelektroden „vergiftet"[2]) und unrichtige Zahlen bei Anwendung von Indikatoren[3]) gibt, so stellt die Bestimmung des p_H-Wertes in chininhaltigen Flüssigkeiten einige Schwierigkeiten dar. *Wales*[4]) bestimmte mittels Titration mit Hilfe der Chinhydronelektrode das p_H der 0,2proz. Lösung des salzsauren Chinins zu 6,12 gleich. Nach den Bestimmungen anderer Autoren schwankt p_H der Chininlösungen von 5,15 bis 6,52[5]).

Die Unanwendbarkeit der Wasserstoffelektroden in diesen Fällen veranlaßte uns, die Chinhydronmethode zu prüfen, und wir überzeugten uns, daß sie hier anwendbar ist, da die Farbe der Lösung nach dem Zusatz von Chinhydron nicht verändert wird und das Potential sich sehr schnell einstellt (Tabelle I).

Tabelle I.

	Konzentration des salzsauren Chinins	p_H			
		Unmittelb. nach der Anfertigung des Gemisches	nach Verlauf von		
			5 Min.	15 Min.	40 Min.
1.	m/20	$6{,}20_6$	$6{,}13_3$	—	$6{,}08_4$
2.	m/80	$6{,}18_4$	—	$6{,}17_3$	—
3.	m/160	6,27	—	$6{,}27_2$	$6{,}26_8$
4.	m/200	$6{,}24_8$	—	$6{,}13_1$	$6{,}13_3$
5.	m/1280	$5{,}97_2$	—	5,95	—
6.	H_2O	$5{,}96_3$	—	—	—
7.	m/160	$6{,}17_3$	6,13	6,13	$6{,}11_1$
8.	m/160	$6{,}13_8$	$6{,}14_8$	$6{,}14_8$	$6{,}14_8$
9.	Das zu verdauende Gemisch mit m/160 ChHCl	7,13	—	—	$6{,}95_9$
10.	Das zu verdauende Gemisch ohne ChHCl	$7{,}04_2$	—	—	$6{,}97_7$

[1]) Einige Reagenzien wurden uns in liebenswürdiger Weise von Frau Dr. *R. M. Plechanowa* zur Verfügung gestellt. Wir benutzen die Gelegenheit, ihr auch an dieser Stelle unseren tiefsten Dank auszusprechen.

[2]) *L. Michaelis*, diese Zeitschr. **106**, 83; **109**, 165, 1920.

[3]) *Derselbe*, Pract. physik. Chem. 39. Berlin 1922.

[4]) *H. Wales*, Ind. and Eng. Chem. **18**, 390, 1926.

[5]) *N. Evers*, Pharm. Journ. **106**, 470, 1921; *Krantz*, Journ. Amer. Pharm. ass. **14**, 294, 1925; *McGill*, Journ. Amer. Chem. Soc. **44**, 2156, 1922; *Masucci* und *Moffat*, Journ. Amer. Pharm. ass. **12**, 609, 1923; zitiert nach *Wales*. *H. B. Rasmussen* und *S. A. Schou*, Pharm. Zentralh. **65**, 729, 1924.

Auswahl des Indikators.

Für die Titration der Chininlösungen werden Kresolpurpur[1]), Bromphenolblau und Methylrot[2]) empfohlen. Auf Grund der Angaben über die p_H-Bestimmung nach der Chinhydronmethode in reinen Chininlösungen wie auch in dem zu verdauenden Gemische, wählten wir für unsere Versuche folgende Indikatoren: mit Puffer $5{,}32_5$ den universellen[3]) Indikator (3,5 bis 7,6), γ-Dinitrophenol (4,0 bis 5,4), Methylrot (4,4 bis 6,0), Bromkresolpurpur (5,2 bis 6,8) und p-Nitrophenol (5,4 bis 7,0); mit Puffer 6,2 den universellen Indikator, p-Nitrophenol und Bromthymolblau (6,0 bis 7,6); mit Puffer 6,61 den universellen Indikator, p-Nitrophenol, Bromthymolblau und Neutralrot (6,5 bis 8,0); mit Puffer 6,8 den universellen Indikator, p-Nitrophenol, Neutralrot, Phenolrot (6,8 bis 8,4) und m-Nitrophenol (6,8 bis 8,4). Die Prüfung der Anwendbarkeit des Indikators wurde folgendermaßen ausgeführt: Zu 50 ccm des *Mc Ilvaine*schen Puffers wurde die betreffende Tropfenzahl des Indikators hinzugefügt; 10 ccm dieser gefärbten Flüssigkeit wurden mit verschiedenen Mengen einer n/20-Lösung des salzsauren Chinins ($p_H = 6{,}20_6$) versetzt und die Farbe mit 10 ccm des Puffergemisches ohne Chinin verglichen.

Tabelle II.

Reagenzglas	Menge des salzsauren Chinins	Gehalt des Gemisches an salzsaurem Chinin	
	ccm	Mol	Proz
1	—	—	—
2	0,1	m/2020	0,02
3	0,5	m/420	0,08
4	1,0	m/220	0,16

In den Versuchen mit p-Nitrophenol hatten die Lösungen in sämtlichen Röhrchen, von oben wie auch von der Seite gesehen, dieselbe Farbe. Mit Neutralrot sahen alle Röhrchen bei seitlicher Betrachtung ebenfalls gleichmäßig aus, von oben wiesen das dritte und vierte eine steigende Violettnuance auf. Der Zusatz von Chinin zur Lösung des mit Bromthymolblau gefärbten Puffers rief nicht nur eine Veränderung der Nuance des Indikators hervor, sondern es entstand noch eine

[1]) *W. J. McGill*, Journ. Amer. Chem. Soc. **44**, 2156, 1922.

[2]) *N. Evers*, Pharm. Journ. **106**, 470, 1921; Chem. and Drogist. **97**, 174, 1922.

[3]) *H. Niklas* und *A. Hock*, Zeitschr. f. Pflanzen-Düng., **3 A**, 402, 1924.

Opaleszenz, welcher Umstand den Vergleich schwierig machte. Noch stärker wird der Ton des Bromkresolpurpurs verändert, so daß für die p_H-Grenzen 5,6 bis 6,6 keine entsprechende Pufferlösung zu finden war. Der universelle Indikator gibt schlecht zu unterscheidende Nuancen. In den Lösungen mit Phenolrot und m-Nitrophenol ruft Chinin keine Änderungen hervor. Bei 0,16 Proz. Chiningehalt fiel in Anwesenheit sämtlicher Indikatoren ein Bodensatz von Chinincitrat aus. Die Farbe der Lösungen wurde dadurch nicht beeinträchtigt. Diese Untersuchungen sprachen für die relative Anwendbarkeit des p- und m-Nitrophenols, γ-Dinitrophenols, Phenolrots, Methylrots und Neutralrots und für die Unanwendbarkeit des Bromthymolblaus, Bromkresolpurpurs und des universellen Indikators für die kolorimetrische p_H-Bestimmung der 0,02- bis 0,2proz. chininhaltigen Lösungen.

Es soll bemerkt werden, daß die kolorimetrische Methode bessere Resultate nicht mit den reinen Chininlösungen, sondern in gepufferten Gemischen gibt (vgl. Tabelle III).

Tabelle III.

	Konzentration von ChHCl in der Lösung	Chinhydronmethode	Universeller Indikator 3,5–7,6	Bromkresolpurpur 5,2–6,8	p-Nitrophenol 5,4–7,0	Bromthymolblau 6,0–7,6	Neutralrot 6,5–8,0	m-Nitrophenol 6,8–8,4
1.	m/160	6,15	> 6,4	eine abweich. Nuance	6,40	6,40*)	—	—
2.	m/160	5,99	—		6,30	6,18*)	—	—
3.	Das zu verdauende Gemisch mit m/160 ChHCl	6,45	6,60	—	6,70	< 6,40*)	—	—
4.	Dasselbe ohne m/160 ChHCl	6,50	6,60	—	6,80	7,00	7,00	—
5.	Dasselbe mit ChHCl	7,13	7,30	—	—	7,10*)	7,40	7,10
6.	Dasselbe ohne ChHCl	$7{,}04_2$	7,60	—	—	7,60	—	7,10

*) Die Lösung ist trübe — der Vergleich ist erschwert.

III. Versuche der Verdauung des Caseins durch Trypsin in Gegenwart von salzsaurem Chinin.

Nach der Feststellung der Anwendbarkeit der Chinhydronmethode wie auch einiger Indikatoren für die Messung der aktuellen Reaktion des Milieus in Gegenwart von Chinin beschäftigten wir uns mit der Frage vom Einfluß des Chinins auf die p_H-Werte des Verdauungsgemisches nach *Gross*. Als Fermentpräparat benutzten wir den natürlichen Saft des Hundes, der uns vom Akademiker *J. P. Pavloff* liebenswürdigerweise aus dem Institut für experimentelle Medizin zu Leningrad zur

Verfügung gestellt wurde, wofür wir ihm unseren tiefsten Dank aussprechen. Die Verdauungskraft dieses Saftes betrug 256 Trypsineinheiten nach *Gross*.

Tabelle IV.

Veränderungen der aktuellen Reaktion des Milieus bei der Verdauung des Caseins durch Trypsin in Abwesenheit von Chininhydrochlorid.

Das Verdauungsgemisch bestand aus 2 Teilen 0,1 proz. Casein, 1 Teil Pankreassaft in der Verdünnung 1 : 256 und 1 Teil Chininlösung oder Wasser.

	Konzentration des ChHCl im Gemisch		p_H-Bestimmung					
			vor der Verdauung			nach der Verdauung		
			nach der Chinhydronmethode	kolorimetrisch		nach der Chinhydronmethode	kolorimetrisch	
	Mol	Proz.		ohne Puffer	mit Neutralrot		ohne Puffer	mit Neutralrot
1.	m/160	0,06	6.45	6,70	7,20	—	—	—
	H_2O	—	6,50	6,80	7,00	—	—	—
2.	m/160	0,06	7,13	7,10	7,40	$6,95_9$	7,10	7,40
	H_2O	—	$7,04_2$	7,10	—	$6,97_7$	7,10	7,40
3.	m/160	0,06	7,13	—	—	6,80	—	—
	H_2O	—	$7,01_9$	—	—	6,97	7,10	—

Die Tabelle IV zeigt, daß nach Verlauf von 30 Minuten die p_H-Werte des verdauenden Gemisches in Anwesenheit von Chinin wie auch ohne Chinin etwas nach der sauren Seite verschoben werden. Chinin allein in der Konzentration von 0,06 bis 0,11 Proz. verändert die aktuelle Reaktion des Milieus nicht, bei 0,5 Proz. wird sie nach der sauren Seite um $0,49_3$ (Tabelle V) verschoben. Bei denjenigen Konzentrationen, in welchen Chinin das p_H des Milieus nicht aus den Grenzen der optimalen Trypsinwirkung verschiebt, ist die hemmende Wirkung auf den Verdauungsprozeß offenbar durch das Chinin selbst bedingt. Die Verschiebung der aktuellen Reaktion nach der sauren Seite, die durch die Hinzufügung stärkerer Chininkonzentrationen hervorgerufen wird, schafft ungünstige Bedingungen für die Verdauung des Caseins, das teilweise aus der Lösung ausfällt, wovon wir uns in einem speziell angestellten Versuch überzeugen konnten (Tabelle V).

Tabelle V zeigt, daß die Chininlösungen von 0,23 bis 0,5 Proz. in den Caseinlösungen eine Fällung hervorrufen; in den abfiltrierten Flüssigkeiten ruft Essigsäure nur eine schwache Trübung hervor, was auf die Ausfällung eines bedeutenden Teiles des Caseins unter der Einwirkung des Chinins hinweist.

Tabelle V.

Die Fällung der Caseinlösung in Gegenwart verschiedener Mengen des salzsauren Chinins.

Zu einer Reihe fallender Chininverdünnungen sind je 2 ccm Casein, 1 ccm Wasser, 5 Tropfen alkoholischer Essigsäurelösung hinzugefügt worden.

Reagenzglas	Konzentration des hinzugefügten ChHCl*)	Proz. des ChHCl im Gemisch	p_H des Gemisches	Zustand des Gemisches nach Hinzufügung von	
				2 ccm Casein	5 Tropfen alkoholischer Essigsäurelösung
1	m/20	0,451	$6,44_1$	Bodensatz	—
2	m/40	0,225	—	"	—
3	m/80	0,112	$6,84_1$	Opaleszenz	Bodensatz
4	H_2O	—	$6,93_4$	durchsichtig	"
5	m/160	0,061	7,13	"	"
6	m/320	0,030	—	"	"
7	m/640	0,015	—	"	"
8	m/1280	0,007	—	"	"
9	m/2560	0,003	—	"	"
10	m/5120	0,002	—	"	"
11	H_2O	—	$7,04_2$	"	"

*) n/20 bis n/5120 Chininlösungen werden durch die alkoholische Essigsäurelösung nicht gefällt

IV. Versuche der Verdauung des Caseins durch Trypsin in Anwesenheit von Harnstoff und seiner Salze.

$^1/_{20}$ Molarlösung des freien Harnstoffs (0,08 Proz. im Gemisch) übt keine Wirkung auf die Trypsinverdauung des Caseins nach der Methode von *Gross* aus und verändert die Wasserstoffionenkonzentration der verdauenden Flüssigkeit nicht.

Tabelle VI.

Die Verdauung des Caseins durch Trypsin in Gegenwart freien Harnstoffs.

Das Gemisch bestand aus: 2 Teilen 0,1 proz. Casein, 1 Teil Pankreassaft in der Verdünnung 1 : 256 und 1 Teil Harnstofflösung oder Wasser.

	Konzentration des hinzugefügten Harnstoffs	Proz. des Harnstoffs im Gemisch	p_H des Gemisches	
			vor der Verdauung	nach der Verdauung
1	m/20	0,08	$6,60_1$	$6,39_5$
	H_2O	—	$6,80_9$	6,54
2	m/20	0,08	$6,46_5$	$6,59_3$
	H_2O	—	$6,45_9$	$6,45_1$

Harnstoffnitrat.

Bei den Versuchen der Verdauung von Casein durch Trypsin in Gegenwart von Harnstoffsalzen, die ohne Rücksicht auf die Reaktion des Milieus ausgeführt wurden, erwies sich, daß große Konzentrationen

dieser Salze (0,02 bis 0,16 Proz.) den Prozeß beschleunigen, während schwache (weniger als 0,01 Proz.) ihn hemmen. Die Bestimmung der p_H-Werte der Lösungen (Tabelle VII) zeigte aber, daß die angebliche beschleunigende Wirkung der Harnstoffsalze in Wirklichkeit dadurch bedingt wird, daß sie die Reaktion des Milieus so stark nach der sauren Seite verschieben ($p_H = 1{,}99$ bis 2,91), daß das Casein von der Essigsäure nicht ausgefällt wird. Die hemmende Wirkung der schwächeren Konzentrationen der Harnstoffsalze (0,01 bis 0,003 Proz.) wird dadurch erklärt, daß sie die Reaktion unter das Optimum[1]) für die Trypsinverdauung des Caseins herabsetzen ($p_H = 3{,}86$ bis $6{,}11_2$), noch schwächere Lösungen üben keinen Einfluß auf den Prozeß aus.

Tabelle VII.

Fällbarkeit des Caseins durch Essigsäure und die Bestimmung des p_H der Gemische in Gegenwart von Harnstoffnitrat.

Das Gemisch bestand aus: 2 Teilen 0,1proz. Casein, 1 Teil Pankreassaft in der Verdünnung 1 : 256 und 1 Teil der Lösung von Harnstoffnitrat oder Wasser.

Reagenzglas	Konzentration des hinzugefügten Harnstoffnitrats	Proz. des Harnstoffnitrats im Gemisch	p_H des Gemisches	Zustand des Gemisches nach Hinzufügung von	
				2 ccm Casein	5 Tropfen alkoholischer Essigsäurelösung
1	m/20	0,16	1,99	durchsichtig	durchsichtig
	H_2O	—	$6{,}76_8$	„	Niederschlag
2	m/40	0,08	—	„	durchsichtig
3	m/80	0,04	2,56	„	„
4	m/160	0,02	$2{,}91_3$	Trübung	Trübung
5	m/320	0,01	3,86	Niederschlag	—
	H_2O	—	$6{,}76_8$	durchsichtig	Niederschlag
6	m/640	0,005	$5{,}64_8$	„	„
7	m/1280	0,0025	$6{,}11_2$	„	„
	H_2O	—	$6{,}76_8$	„	„
8	m/2560	0,0012	—	„	„
	H_2O	—	$6{,}76_8$	„	„
9	m/5120	0,0006	—	„	„

V. Versuche der Verdauung des Caseins durch Trypsin in Gegenwart von der Doppelverbindung Chininhydrochlorid-Harnstoff.

Nachdem die Ursache der Wirkung der Harnstoffsalze auf den Prozeß der Verdauung des Caseins aufgeklärt war, entstand die Notwendigkeit, einen Versuch mit Chininhydrochlorid-Harnstoff unter den gleichen Bedingungen wie in der Tabelle VII anzustellen.

[1]) *J. A. Smorodinzew* und *A. N. Adowa*, Zeitschr. f. phys. Chem. **160**, 189, 1926.



Tabelle VIII.

Fällbarkeit des Caseins durch Essigsäure und die Bestimmung des p_H der Gemische in Gegenwart von Chininhydrochlorid-Harnstoff.

Das Gemisch bestand aus: 2 Teilen 0,1 proz. Casein, 1 Teil Pankreassaft in der Verdünnung 1 : 256 und 1 Teil der Lösung Chininhydrochlorid-Harnstoff oder Wasser.

Reagenzglas	Konzentration des hinzugefügten Chininhydrochlorid-Harnstoffs	Proz. des Chininhydrochlorid-Harnstoffs im Gemisch	p_H des Gemisches	Zustand des Gemisches nach der Hinzufügung von	
				2 ccm Casein	5 Tropfen alkoholischer Essigsäurelösung
1	m/1	11,44	$2{,}23_3$	durchsichtig	durchsichtig
2	m/2	5,72	—	„	„
3	m/4	2,86	—	„	„
4	m/8	1,43	—	„	„
5	m/16	0,72	$3{,}08_5$	„	„
6	m/32	0,36	$3{,}37_4$	steigende Trüb.	—
7	m/64	0,18	—	„	—
8	m/128	0,09	—	„	—
9	m/256	0,045	$4{,}68_8$	„	—
10	m/310	0,037	$5{,}08_6$	schwache Trüb.	Trüb. stärker
11	m/512	0,022	—	durchsichtig	Niederschlag
12	m/1024	0,011	$5{,}71_8$	„	„
13	m/2048	0,006	$6{,}30_9$	„	„
14	m/2480	0,005	$7{,}06_1$	„	„
15	H_2O	—	$7{,}27_6$	„	„

Tabelle VIII zeigt, daß in den Gemischen, die 0,7 bis 11,4 Proz. Chininhydrochlorid-Harnstoff enthalten, das Casein durch das Trypsin nicht verdaut werden kann und von Essigsäure nicht gefällt wird, da die Wasserstoffionenkonzentration zwischen p_H $3{,}37_4$ bis $2{,}23_3$ sich bewegt, d. h. unterhalb des isoelektrischen Punktes. Bei niedrigeren Konzentrationen des Präparats (0,4 bis 0,04 Proz.) fällt das Casein aus und p_H bleibt noch unterhalb des Optimums der Trypsinwirkung ($4{,}68_8$). Aber bei 0,005 Proz. des Chininharnstoffs im Gemisch entspricht p_H ($7{,}06_1$) dem Optimum der Einwirkung des Trypsins auf das Casein, trotzdem wird die Verdauung verzögert; daraus folgt, daß die hemmende Wirkung dieser Konzentrationen der Veränderung der Reaktion des Milieus nicht zugeschrieben werden kann — sie hängt offenbar von der unmittelbaren Einwirkung des Präparats selbst ab.

Es ist also wiederum erwiesen, daß bei den Untersuchungen über die Wirkung verschiedener Stoffe auf die Fermente immer mit der aktuellen Reaktion des Milieus, die in Gegenwart verschiedener Verbindungen beträchtlich verändert werden kann, gerechnet werden muß. Der Einfluß, der anscheinend von der direkten Einwirkung der Harnstoffsalze abhängig war, erwies sich in Wirklichkeit als ein indirekter, durch die Verschiebung der Reaktion des Milieus in die für die Trypsin-

wirkung ungünstige Richtung bedingt. Andererseits gelang es uns zu beweisen, daß die hemmende Wirkung sämtlicher untersuchten Chininpräparate auf die Trypsinverdauung des Caseins von der Milieureaktion unabhängig ist, da sie sich auch bei dem für das Trypsin optimalen p_H-Wert äußert. In vorliegender Mitteilung konnten wir sämtliche Schlußfolgerungen unserer vorherigen Arbeit[1]) auch in den neuen Bedingungen bestätigen.

Schlußfolgerungen.

1. Die Chinhydronmethode ermöglicht die Bestimmung der aktuellen Reaktion des Milieus in chininhaltigen Lösungen.

2. Für die kolorimetrische Bestimmung der p_H-Werte des Milieus bei der Trypsinverdauung des Caseins in Gegenwart von Chinin ergeben die meisten von uns geprüften Indikatoren keine richtigen Resultate.

3. Die p_H-Werte der Lösungen des salzsauren Chinins, nach der Chinhydronmethode bestimmt, schwanken zwischen 5,97 bis 6,20.

4. Hinzufügung von salzsaurem Chinin in den Konzentrationen 0,06 bis 0,11 Proz. verändert die aktuelle Reaktion des Verdauungsgemisches nach *Gross* nicht.

5. Stärkere Konzentrationen des salzsauren Chinins (0,5 Proz.) verschieben die Reaktion des Gemisches nach der sauren Seite.

6. Die p_H-Werte der *Gross*schen Lösung werden nach Verlauf von 30 Minuten in Gegenwart von Chinin wie auch ohne Chinin ein wenig nach der sauren Seite verschoben.

7. Das salzsaure Chinin übt eine hemmende Wirkung auf die Trypsinverdauung des Caseins ohne Zusammenhang mit dem p_H des Milieus aus.

8. Freier Harnstoff übt keine Wirkung, weder auf die Caseinverdauung noch auf die Wasserstoffionenkonzentration des Milieus, aus.

9. Die Einwirkung der Harnstoffsalze auf die Verdauung wird ausschließlich dadurch erklärt, daß sie die p_H-Werte des Milieus beträchtlich verändern.

10. Höhere Konzentrationen des Chininhydrochlorid-Harnstoffs verschieben die p_H-Werte nach der sauren Seite.

11. Der hemmende Einfluß der schwachen Konzentrationen des Chininhydrochlorid-Harnstoffs wird durch die Wirkung des Chinins selbst auf den Prozeß erklärt und hängt von der Reaktion des Milieus nicht ab.

---

[1]) *J. A. Smorodinzew* und *A. N. Adowa*, diese Zeitschr. **135**, 128, 1923.

Beiträge zur Wirkung des Insulins.

II. Mitteilung: Insulin-Adrenalin-Antagonismus[1]).

Von

B. v. Issekutz.

(Aus dem pharmakologischen Institut der Kgl. Ungarischen Universität in Szeged.)

(Eingegangen am 17. Januar 1927.)

Mit 2 Abbildungen im Text.

In der ersten Mitteilung (1) wurde gezeigt, daß das Insulin eine direkt hemmende Wirkung auf die Glykogenhydrolyse der isolierten Froschleber ausübt; während nämlich die Lebern der normalen Frösche stündlich 2,59 mg Glucose bilden (auf 1 g Leber gerechnet), bilden die der 24 bis 48 Stunden vor dem Versuch mit Insulin behandelten Tiere nur 0,53 mg, also etwa ein Fünftel der normalen.

Es ist natürlich von größter Bedeutung, diese an der Froschleber festgestellte Wirkung auch an Säugetieren nachzuweisen, obwohl wir schon mehrere indirekte Belege haben, daß das Insulin auch bei diesen eine direkte Wirkung auf die Glykogensynthese und -hydrolyse hat.

So fanden *Cori* (2) und seine Mitarbeiter, daß der Blutzucker am Anfang der Insulinwirkung zuerst in der V. hepatica und nur später in der V. jugularis abnimmt, daraus folgt, daß das Insulin die Glykogenhydrolyse in der Leber hemmt. Dieselben beobachteten in Versuchen, bei denen sie durch Bauchfenster kleine Leberstücken von Kaninchen entnahmen, daß eine Glykogensynthese in den normalen Lebern nur dann vorkommt, wenn diese mehr als 0,25 Proz. Glucose enthalten. Hingegen kann diese während der Insulinwirkung schon bei einem viel geringeren Glucosegehalt stattfinden. Also das Insulin befördert diese Synthese. Nach ihren Versuchen nimmt das Leberglykogen bei hungernden Kaninchen, obwohl der Blutzucker schon vermindert ist, in der ersten Stunde der Insulinwirkung nicht ab. Ferner bildet sich Glykogen unter Insulinwirkung aus dem Blutzucker bei den mit Phlorrhizin behandelten hungernden Tieren. Gleicherweise erreichten

[1]) Ausgeführt mit Unterstützung des „Ungarischen Naturwissenschaftlichen Landesfond."

Frank, Hartmann und *Nothmann* (3) bei Kaninchen, die sie mehrere Tage hindurch hungern ließen, durch ganz kleine Dosen von Insulin eine Glykogenanreicherung in der Leber. Diese Resultate dürfen aber nur mit einer Vorsicht verwertet werden, denn *A. Grevenstuk* und *E. Laqueur* (4) konnten auch durch subkutan injizierte n/100 HCl eine Zunahme des Leberglykogens erreichen. Die hemmende Wirkung des Insulins auf die Glykogenhydrolyse beweisen sehr schön die Versuche von *Macleod, Noble* und *O. Brien* (5). Das Leberglykogen nahm nämlich bei Kaninchen während einer lange dauernden Urethannarkose von 8,64 auf 3,5 Proz. ab, wenn aber die Tiere mit Urethan auch Insulin erhielten, blieb der Glykogengehalt unverändert. Ferner beträgt das Leberglykogen der mit Adrenalin behandelten Tiere nur 4,87 Proz., das der Tiere aber, die mit Adrenalin und Insulin behandelt wurden, 8,8 Proz.

Es ist eine viel schwerere Aufgabe, diese Insulinwirkung auch an überlebenden Säugetierlebern nachzuweisen, und zwar deshalb, weil sie die Fähigkeit der Glykogensynthese während der Präparation und Durchströmung schnell verlieren.

Die Hundelebern sind am geringsten empfindlich, sie behalten am besten ihre Fähigkeiten, und so gelang es *Grube* (6) und *Barrenscheen* (7), an überlebenden Hundelebern eine Glykogensynthese zu erreichen. An den Lebern von Kaninchen, Meerschweinchen und Ratten gelingt dies schon kaum, diese geben durch Glykogenhydrolyse der durchströmenden Flüssigkeit Zucker ab. So ist es verständlich, weshalb es *Bernhardt* (8) nicht gelang, die hemmende Wirkung des Insulins auf die Glykogenhydrolyse an durchströmten Rattenlebern nachzuweisen, hingegen konnte *Bindi* (9), der an den widerstandsfähigeren Hundelebern arbeitete, positive Resultate erhalten. So nahm in seinen Versuchen die Zuckerbildung der durchströmten Leber unter der Insulinwirkung ab. Als er die zwei Hälften der Leber getrennt durchströmen ließ, war der Glykogengehalt der mit insulinhaltigem Blute durchströmten Hälfte immer größer als die andere. An Lebern pankreasdiabetischer Tiere gelang es ihm, zu beweisen, daß das Insulin die Glykogensynthese fördert.

Obwohl es unzweifelhaft ist, daß die Insulinhypoglykämie durch Adrenalininjektion aufgehoben werden kann, und umgekehrt die Adrenalinhyperglykämie durch Insulin, folgt daraus noch nicht, daß die Angriffspunkte der beiden Hormone identisch sind, es wäre nämlich auch möglich, daß das Insulin die Adrenalinhyperglykämie nur durch eine gesteigerte Oxydation des gebildeten Zuckers verhindert.

Doch meinen Versuchen (1) nach, die ich an überlebenden Froschlebern durchführte, wirken beide Hormone auf die Leber direkt antagonistisch: das Adrenalin mindert die auf die Glykogenhydrolyse ausgeübte hemmende Wirkung des Insulins, das Insulin hemmt dagegen die zuckermobilisierende Wirkung des Adrenalins. Zur Geltung gelangt die Wirkung desjenigen Hormons, welches dominierend vorhanden ist.

Zwischen der Wirkung zweier Stoffe herrscht nicht nur dann ein Antagonismus, wenn der eine die Wirkung des anderen vollständig aufhebt, sondern auch dann schon, wenn die Wirkung bedeutend gehemmt wird.

Daher ist das Argument *Lessers* (10), nach welchem bei meinen Froschleberversuchen zwischen Insulin und Adrenalin kein Antagonismus vorhanden gewesen sein sollte, weil das Adrenalin die Zuckerbildung auch mit Insulin behandelter Leber steigerte, nicht richtig, weil diese Steigerung in den meisten Versuchen nur sehr klein war. Während nämlich die Zuckerbildung normaler Leber auf die Wirkung des Adrenalins im Mittelwerte (pro 1 g Leber) sich von 2,59 auf 5,39 mg (= 108 Proz.) steigerte, nahm die der mit Insulin behandelten Tiere von 0,53 auf 0,82 mg[1]) zu (= 55,0 Proz.), im ganzen also nur mit 0,29 mg. Diese bildeten also auch unter der Adrenalinwirkung viel weniger Zucker, als die normalen Lebern ohne Adrenalin. Dabei muß auch in Betracht genommen werden, daß ich das Adrenalin in starker Konzentration verwandte (1 : 200000), welche die Zuckerbildung der normalen Leber mit 108 Proz. steigerte. Es ist unzweifelhaft, daß das Adrenalin bei den mit Insulin behandelten Lebern unwirksam geblieben wäre, wenn ich es in einer viel schwächeren, bei normalen Lebern eben wirksamen Konzentration angewandt hätte. Ein ganz ähnliches Resultat hatten die Experimente von *Bornstein* und *W. Griesbach* (11) an durchströmten Hundelebern, in denen das Adrenalin (auf 1 g Leber gerechnet) eine Zuckerbildung von 7 mg verursachte, in Gegenwart von Insulin aber nur eine von 0,8 mg.

Da aber die Zuckerbildung der Hundeleber sehr gering ist, erscheint der Einwand *Lessers* (10), daß es möglich ist, daß unter Insulinwirkung der durch Adrenalin mobilisierte Zucker oxydiert worden ist und der Blutzucker deshalb nicht zugenommen hat, für rechtmäßig; obwohl es so nicht verständlich wäre, weshalb das Insulin ohne Adrenalin keine Abnahme des Blutzuckers verursachte. Es scheint aber, als ob zwischen Adrenalin und Insulin nicht nur in der Beziehung der Zuckermobilisierung, sondern auch in der Beziehung der Zuckeroxydation ein Antagonismus herrscht. *G. Ahlgreen* (12) nahm wahr, daß das Adrenalin die fördernde Wirkung des Insulins auf die Oxydation des Froschmuskels hemmt; als *Gottschalk* (13) zeigte, daß Adrenalin die Steigerung der Acetaldehydbildung durch Insulin in der Leber hemmt, gab er der Meinung Ausdruck, daß Insulin und Adrenalin bezüglich der Bildung derjenigen labilen Glucosemodifikation, welche die Verbrennung des Zuckers einführt, Antagonisten sind.

Der Zweck meiner Versuche war, die an Froschleber wahrgenommenen Insulinwirkungen auch an Kaninchenlebern zu beweisen. Mein Bestreben war, mich den physiologischen Verhältnissen möglichst gut zu nähern. Da ich trotz diesem keine Glykogensynthese erreichen konnte, untersuchte ich die völlig unverletzt gebliebene Leberfunktion: Die Steigerung der Zuckerbildung durch Adrenalin und die hemmende Wirkung von Insulin dieser gegenüber.

Versuchsanordnung.

Die Konstruktion meines Durchströmungsapparats, zu welcher ich die Grundidee von *Skramlik* (14) benutzte, zeigt Abb. 1. In dem dickwandigen Gefäß *A*, welches oben luftdicht verschlossen ist, liegt auf einem Glastischchen die herausgenommene Leber, in dessen V. portae eine Kanüle

[1]) In der Tabelle III der I. Mitteilung (1) ist dieser Mittelwert unrichtig angegeben.

eingebunden ist. Das leberdurchströmte Blut fließt aus der geöffneten V. hepatica durch eine am Grunde des Gefäßes befindliche Röhre ab. Vorrichtung *K* bläst durch eine unten eingelötete Nebenröhre Sauerstoff ein, treibt damit das Blut durch Spirale *O* in das Gefäß *B* und oxydiert dasselbe. Das Ventil *R* vor der Nebenröhre verhindert die Rückströmung des Blutes und Sauerstoffs. Aus dem Reservoir *B* läßt eine Pumpenvorrichtung das Blut rhythmisch durch die Leber strömen. Diese besteht aus einer Spritze mit 10 ccm Inhalt *D*, die ein Motor treibt; diese übt auf die

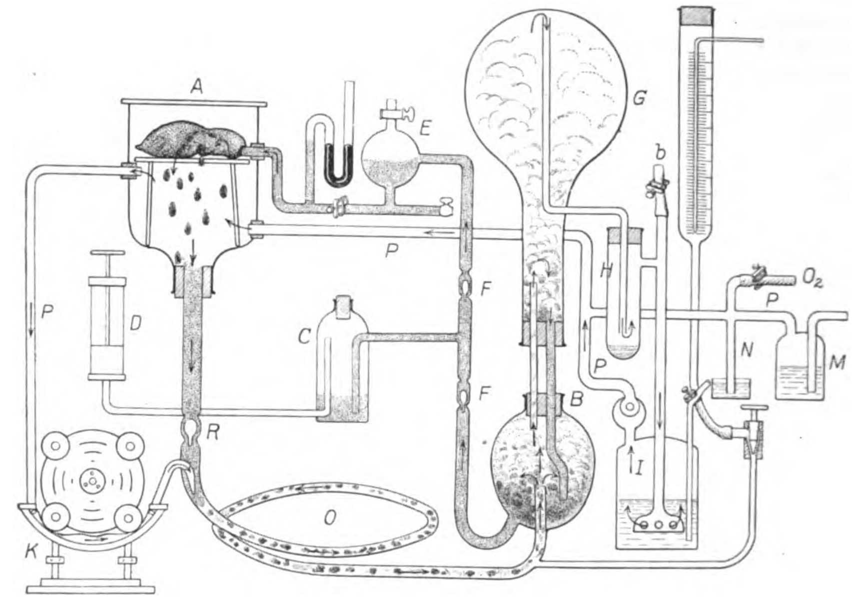


Abb. 1.

in das Gefäß *C* eingeschlossene Luft eine Saug- und Druckwirkung aus, welche sich auf das am Grunde des Gefäßes befindliche Blut und durch die in das Blut eingreifende Röhre auf die Klappen *F* übersetzt, welche den Weg des Blutes in der Richtung des Reservoirs *E* bestimmen. Das Blut strömt in der oberen Hälfte des Reservoirs ein und entfernt sich unten durch eine T-Röhre. In den einen Zweig dieser Röhre reicht bis zur Mitte eine mit einem Hahn versehene Kanüle, durch diese können Blutproben entnommen werden. Der andere Zweig dieser T-Röhre steht einerseits mit einem Hg-Manometer, andererseits mit einer Kanüle, welche in die V. portae eingebunden ist, in Verbindung.

Das Blut strömt aus dem Gefäß *B* in das Gefäß *E*, von hier durch die Leber in das Gefäß *A*, von hier durch die Spirale *O* zurück in das Gefäß *B*. Der Sauerstoff ist, in einem geschlossenen Röhrensystem ebenfalls in Zirkulation, so daß das CO_2, welches die Leber bildet, bestimmt werden kann.

Die Pumpenvorrichtung *K*[1]) besteht aus einer Gummiröhre, welche in einem stählernen Kahn von regulierbarer Biegung liegt. Auf dieser

[1]) Hergestellt von dem Universitätsmechaniker *O. Klein*, Szeged.

Gummiröhre wandern vier Ebonitwalzen entlang, welche sich an den vom Motor getriebenen Rade befinden, und blasen hierdurch die Luft in der Richtung der Umdrehung. Die Menge der beförderten Luft kann durch die Änderung des Gummirohrdurchmessers, durch die Umdrehungsgeschwindigkeit des Rades und durch die Klemme, welche vor der Pumpe angewendet ist, zwischen weiten Grenzen geändert werden. Der Sauerstoff, welcher die Pumpe treibt, vermengt sich in der Spirale *O* und in dem Gefäße *B* mit dem Blute, oxydiert dasselbe und nimmt CO_2 auf; gelangt von hier durch die Schaumgefäße *G* und *H* in das Absorptionsgefäß *I*, in welchem 0,2 n NaOH-Lösung das CO_2 absorbiert, dann gelangt es durch die Röhre *P* in das Gefäß *A* und von dort zurück in die Pumpe *K*. *N* und *M* dienen zum Ausgleich der Druckdifferenzen. Durch *N*, dessen Ende in Wasser taucht, entfernt sich bei wachsendem Druck der überflüssige Sauerstoff, welcher sich bei abnehmendem Druck aus der Waschflasche *M* ergänzt. Die Anfüllung des ganzen Apparats mit O_2 geschieht durch die Röhre *Q*, wobei die Nebenröhre *b* offen ist. Aus der CO_2 absorbierenden Lauge kann zeitweise durch den Hahn *c* eine Probe entnommen werden.

Der ganze Durchströmungsapparat ist, mit Ausnahme der Pumpen, in einem aus Holz angefertigten Thermostaten aufgestellt. Dieser besteht aus einem außen doppelwandigen und innen mit einer Isolierschicht bedeckten Holzkasten (105 × 90 × 110 cm), in welchem sich der innere Kasten, aus Zinkplatte verfertigt, befindet (70 × 50 × 80 cm). Im Raume zwischen den beiden Kästen brennen sowohl an den Seiten als auch unten elektrische Birnen; unten brennen zwei Stück 32er Kohlenfadenbirnen fortwährend, welche die Temperatur des Thermostats auf 35 bis 36° halten. An den Seiten befinden sich zwölf Stück 16er Birnen, welche durch ein Kontakt-Thermometer entzündet und ausgelöscht werden. Durch diese Einrichtung kann der ganze Kasten schnell auf 38° C erwärmt werden und behält seine Temperatur mit kleinen Schwankungen. Von den drei Türen des Thermostats hat die innere an den beiden Flügeln je drei Fenster, so daß man bei der Herausnahme von Blut- und Laugeproben den inneren Kasten nicht ganz öffnen muß, sondern nur das entsprechende Fensterchen der inneren Tür. Hierdurch kann eine beträchtlichere Abkühlung des Thermostats bei der Herausnahme von Proben vermieden werden.

Da sich aus einigen Versuchen zeigte, daß die überlebende Kaninchenleber eine sehr bedeutende Menge von Säuren bildet und infolgedessen das p_H des im Apparat zirkulierenden Blutes rasch abnimmt (binnen 2 Stunden sinkt es unter 6,0), mußte ich die Neutralisierung der gebildeten Säuren ausführen. Da ich dieses durch Dialyse nicht erreichte, gab ich bei fortwährender Kontrolle des p_H dem Blute im langsamen Strome isotonische 0,15 n NaOH oder $NaHCO_3$ zu.

Zu diesem Zwecke verband ich das Ende der Spirale *O* mit Hilfe einer T-Röhre mit einer Bürette, in welche eine Niveauröhre hineinlangt, an deren freiem äußeren Ende das Eintreten der Luft eine feine Kapillare verzögert. Die Bürette setzt sich unten in einen Regulierapparat aus Ebonit vor, dessen konischer Zapfen in dem ebenso angeformten Lager durch eine feine Schraube gehoben und gesenkt wird, wodurch der Ausfluß, auch bei der langsamsten Strömung (0,1 bis 0,5 ccm pro Minute), pünktlich reguliert werden kann.

Zu den Versuchen verwendete ich mit Getreide reichlich gefütterte Kaninchen, damit ihre Leber viel Glykogen enthalte. In Novocain-Lokalanästhesie band ich die Kanüle in die Trachea, Carotis und V. jugularis

ein, und während in langsamem Strome physiologische Lösung[1]) in die Jugularis floß, ließ ich das Tier verbluten und defibrinierte das Blut. Nach Durchschneiden des Halsmarkes öffne ich die Bauchwand und den Brustkasten, schneide den Magen heraus, unterbinde die A. hepatica, setze eine Kanüle in die V. portae und durchwasche durch diese die Leber; nehme sie bald schnell heraus und setze sie nach der Unterbindung und dem Abschneiden eines kleinen Läppchens in den Apparat, welchen vorher der Gehilfe mit Blut anfüllte, welches auf 250 ccm ergänzt wurde, etwa vierfach verdünnt war und 0,1 Proz. Glucose enthielt.

Die Leberkanüle wurde mit der entsprechenden Röhre verbunden und die Blutzirkulation begann sofort. Bei einem Quecksilberdruck von 15 bis 20 mm strömt etwa 100 ccm Blut pro Minute durch. Die Operation vollzog ich möglichst rasch, so daß die Leber höchstens 1 Minute lang ohne Blutzirkulation blieb.

Zwecks ständiger Kontrolle des p_H-Blutes entnahm ich alle 3 bis 5 Minuten mit einer Spritze durch die Kanüle, welche sich am Reservoir *E* befindet, 1 ccm Blut. In der ersten Versuchsreihe benutzte ich eine H_2-Elektrode nach *Michaelis* und hatte, da sich dessen Potential langsam einstellt, so lange mit Schwierigkeiten zu kämpfen, bis ich auf Chinhydron überging, welches ich in der Spritzelektrode nach *Mislowitzer* (14) anwandte und die Potentialdifferenz 0,01 n HCl + 0,09 n KCl gegenüber maß. Hier stellt sich die Potentialdifferenz in einigen Sekunden ein, so braucht eine Bestimmung weniger als ½ Minute Zeit; wodurch ich die Einströmung der Lauge am pünktlichsten regulieren konnte und hierdurch erreichte, daß sich die p_H des Blutes in einem nicht größeren Maße als 0,3 änderte.

Nachdem ich die Einströmung der Lauge regulierte, entnahm ich die erste Blutprobe. Von dieser maß ich 5 ccm in einen 50-ccm-Kolben, verdünnte sie mit destilliertem Wasser, enteiweißte nach *Folin* mit Wolframsäure, ergänzte sie auf 50 ccm und bestimmte den Zuckergehalt der Filtrate in drei Proben nach der von uns modifizierten Methode von *Hagedorn-Jensen*.

In dem Gefäße, in welchem das CO_2 absorbiert wird, sind 140 ccm 0,2 n NaOH-Lösung. Gleichzeitig mit der Blutprobe entnehme ich durch den Hahn *c* 20 ccm Lauge aus diesem Gefäß, lasse dieselbe in 80 ccm heißer 8proz. $BaCl_2$-Lösung und titriere sie nach der Abkühlung mit n/10 HCl.

Nach 1 Stunde entnahm ich wieder 20 ccm Lauge und titriere dieselbe. Die Differenz der beiden Titer, multipliziert mit 6 und 1,12, ergibt die während einer Stunde absorbierte Quantität vom CO_2. Hierbei muß noch die Veränderung der CO_2 des Blutes in Rechnung genommen werden, welche ich im Apparate nach *van Slyke* bestimmte.

Die Zuckerbildung der Leber maß ich in Perioden von 20 bis 30 Minuten, zog bei der Rechnung natürlich die Volumenänderung des Blutes in Betracht, welches einerseits durch das herausgenommene Blut verkleinert, andererseits durch die dazufließende Lauge vergrößert wird.

Ich vollzog im ganzen 75 Versuche, von denen 20 mit der Ausarbeitung der Methode vergingen. In den nächsten 25 Versuchen konnte ich die p_H des Blutes noch nicht genügend pünktlich regulieren und

---

[1]) Enthält in 1 Liter: 8,5 g NaCl, 0,2 g $CaCl_2$, 0,1 g KCl, 5 ccm Phosphatlösung (4,776 Proz. Na_2HPO_4 + 0,275 Proz. NaH_2PO_4) und 0,2 g $NaHCO_3$.

konnte nur in den letzten 30 Versuchen, wo ich mit der Chinhydronelektrode arbeitete, die Bedingungen des Versuchs völlig beherrschen.

Den Verlauf eines Versuchs zeigt die Tabelle I. Aus diesem und aus anderen Versuchen kann festgestellt werden, daß die durchströmte Leber ihre Vitalität mindestens 3 Stunden behält, und während dieser Zeit verringert sich ihr Stoffwechsel und ihre CO_2-Bildung kaum.

In der Leber gut genährter Tiere, die viel Glykogen enthält, geht die Glykogenhydrolyse während der Durchströmung mit einer beträchtlichen Geschwindigkeit vor sich, der Zuckergehalt des Blutes steigt fortwährend und erreicht auch 0,7 bis 0,9 Proz., ohne daß sie hierdurch die Zuckerbildung der Leber verringerte. Die Zuckerbildung ist während der Zeit des Versuchs (s. Tabelle II) ziemlich konstant, vielfach ist sie am Anfang größer, verringert sich später um etwas, aber es kann häufig auch umgekehrt vorkommen. Im allgemeinen können wir sagen, daß die p_H des Blutes die Glykogenhydrolyse bedeutend beeinflußt, bei abnehmender p_H ist dieselbe rascher, bei zunehmender kleiner. Dieses kann aus dem Versuch 57 sehr schön ersehen werden, wo sich die p_H des Blutes zwischen 7,4 — 7,92 — 6,96 veränderte und die Glucosebildung 59,0 — 30,6 — 55,0 mg war.

Die Zuckerbildung der Leber verschiedener Tiere ist sehr verschieden, und wir erhalten auch dann große Differenzen, wenn wir die Zuckerbildung auf 1 g Leber berechnen; so schwankte z. B. in jenen 18 Versuchen, welche in der Tabelle III angeführt sind, die Zuckerbildung von 1 g Leber in 10 Minuten zwischen 0,47 bis 2,03 mg. Der Zusammenhang zwischen dem Glykogengehalt und der Zuckerbildung der Leber ist sehr lose, und es kann im allgemeinen nur gesagt werden, daß die Leber von größerem Glykogengehalt mehr Glucose erzeugt als diejenige, welche an Glykogen ärmer ist. Die Quantität der Glucose, welche in 10 Minuten aus 1 g Glykogen entstand, schwankte zwischen 4,95 bis 40,8 mg. Diejenigen Lebern (Versuche 32, 34, 44, 45, 46, 64), welche kein Glykogen oder dasselbe nur in Spuren enthalten, bilden keine Glucose, bei diesen ist natürlich auch das Adrenalin unwirksam.

Die Quantität der Lauge, welche dem Blute zugegeben werden mußte, um das p_H des Blutes innerhalb der physiologischen Grenzen zu halten, gibt die Säurebildung der Leber genügend pünktlich an. In der ersten Periode des Versuchs ist nur wenig Lauge notwendig (s. Tabelle II), da die Säuren, welche die Leber bildet, größtenteils die Pufferstoffe des Blutes neutralisieren. Die Quantität der verbrauchten Lauge nimmt in der zweiten Periode zu und behält auch in den folgenden Perioden diesen größeren Wert ohne zu großer Schwankung. Diese Versuche sind also nicht nur zur Beobachtung der Änderung in der Zuckerbildung, sondern auch der in der Säurenbildung geeignet.

In der Tabelle III sind diejenigen Versuche zusammengestellt, welche ich mit Adrenalin ausführte. Die Wirkung des Adrenalins auf die Glykogenhydrolyse der durchströmten Leber untersuchten schon viele; während *Iwanov*, *Masing* (16) u. a. fanden, daß das Adrenalin die Zuckerbildung der Leber im größeren Maße steigert, konnte *Abelin* (17) diese Steigerung nicht beobachten. Die Ursache des negativen Resultats von *Abelin* besteht darin, daß er, von den anderen Versuchern abweichend, die Leber mit Ringerlösung und nicht mit Blut durchströmen ließ, und die Leber verlor infolge mangelhafter Sauerstoffversorgung nicht nur ihre Glykogenbildungsfähigkeit, sondern auch ihre Adrenalinempfindlichkeit.



Tabelle 1.

Kaninchen, Gewicht 2690 g. Die Operation beginnt um 9h 20'. Die Kanüle wird um 9h 40' in die V. portae eingebunden, die Leber mit Kochsalzlösung durchströmt. Um 9h 43' beginnt die Durchströmung mit Blut.

Versuch 58.

Zeit	Periode	Blutvolumen in ccm	Blutzucker				p_H	0,15 n NaOH	CO_2 in Blut		Bestimmung der CO_2					Atmungs-CO_2 in ccm	CO_2 pro 10 Min.
			Proz.	mg	Diff.	pro 10 Min.		ccm	Proz.	Diff.	n/10 HCl	Diff.	in ganzen	CO_2 ccm	Blut CO_2		
9 55'	I	229	0,414	947			7,42		0,16		35,35						
10 25	I	237	0,549	1282	335	101,6	7,34	8,3									
10 25	II	221	0,549	1212			7,28										
10 55	II	236	0,637	1500	288	96	7,21	15,2	0,11	0,05	26.6	8,75	52,5	58,8	--11,8	47,0	7,83
10 55	III	217	0,637	1380			7,24		0,11		26,6						
11 25	III	236	0,718	1695	315	105	7,34	16,5									
11 25	IV	221	0,718	1585			7,34										
11 55	IV	233	0,783	1800	215	70,2	7,40	15,5	0,13	0,02	19,5	7,1	35,5	39,7	4,6	44,3	7,38
11 55	V	214	0,783	1675			7,32				19,5						
12 35	V	226	0,897	2022	347	86,8	7,27	15,8	0,12	0,01	12,5	7,0	28	31.4	— 2,6	28,8	7.20

Tabelle II.

Versuch Nr.	Gewicht der Kaninchen	Gewicht der Leber	Glykogen vor dem Versuch	Glykogen nach dem Versuch		Periode I	II	III	IV	V
31	1660	44	6,9	4,06	Glucose pro 10′	54,5	45,3	47,2	49,0	—
					p_H	7,36	7,43	7,36	7,34	—
					0,15 n NaOH pro 15′	5,6	4,9	4,1	6,5	—
33	1560	40	5,83	4,3	Glucose pro 10′	33,3	36,6	33,3	47,6	—
					p_H	7,36	7,65	7,63	7,5	—
					0,15 n NaOH pro 15′	3,5	5,2	5,6	4,6	—
57	2150	58	3,36	1,67	Glucose pro 10′	59	63,5	35,8	30,6	55
					p_H	7,4	7,3	7,75	7,92	6,96
					0,15 n NaOH pro 15′	3,1	2,6	5,6	2,0	—
59	2080	80	11,45	8,58	Glucose pro 10′	53	70,6	88	68	60
					p_H	7,52	7,28	7,48	7,57	7,55
					0,15 n NaOH pro 15′	4,3	7,2	11,6	9,48	10,5
60	2300	50,9	8,0	5,05	Glucose pro 10′	19,5	12,8	32,8	25,3	—
					p_H	7,81	7,66	7,40	7,52	—
					0,15 n NaOH pro 15′	1,6	7,68	6,95	7,1	—
62	2400	66	9,6	4,7	Glucose pro 10′	103	104	102	110	—
					p_H	7,2	7,2	7,32	7,42	—
					0,15 n NaOH pro 15′	2,5	9,2	12,1	11,8	—

Tabelle III.

Versuch	Gewicht der Kaninchen	Gewicht der Leber	Glykogen in Proz.		Zuckerbildung in mg			p_H	0,15 n NaOH pro 30 Min.	Adrenalin					
Nr.			vor dem Versuch	nach dem Versuch	pro 10 Min.	pro 1 g Leber	pro 1 g Glykogen			Dosis in mg	Zucker pro 10 Min.	Zunahme mg	Zunahme Proz.	p_H	0,15 n Lauge pro 30 Min.
23	2025	57,5	2,9	1,2	112	1,95	67	7,5		0,5	107	- 5		7,6	
24	2090	99	2,54	0,71	74	0,75	2,96	7,5		0,5	209	134	181	7,4	
25	1450	47	10,6	5,7	40,3	0,86	8,12	7,1		0,5	74,5	34,2	85	6,8	
26	2000	85	3,6	1,8	73	0,86	23,8	7,7		0,5	78	5		7,8	
27	1990	56	0,5	0	11,4	0,24	40,8	7,3	1,0	0,5	15,5	4,1	36	7,1	2,7
28	980	32,4	6,2	4,14	66	2,03	32,8	7,6	4,0	0,5	57,6	- 8,4		7,6	4,1
29	1300	24,9	3,5	0,25	35	1,4	40,0	7,4	2,78	0,5	102	67	191	7,1	2,97
30	2515	44,5	5,46	1,91	12	0,27	4,95	7,2	4,84	0,5	49,5	37,5	313	7,3	9,2
35	1980	49,2	3,53	0,95	43	0,88	24,8	6,8	2,68	1,0	72	29	67,5	6,7	5,4
36	1945	46,5	2,87	1,45	24	0,518	18,0	7,15	3,82	1,0	50	26	108,0	6,9	5,2
37	1700	56,5	6,75	3,64	48	0,85	12,6	7,7	7,0	1,0	22	- 26		7,9	9,0
38	2300	58	1,68	0,6	10	0,17	10,3	7,0	6,0	1,0	43,2	33,0	332	7,0	9,8
55	2400	89,6	13,7	10,8	74,6	0,83	6,07	6,87	8,0	0,7	418	343,4	456	7,2	10,2
63	2700	75,5	9,2	8,35	75	0,99	10,8	7,25	10,0	0,5	163	88	117	7,25	14,4
65	2650	78	8,57	3,22	72	0,93	10,8	7,16	12,3	0,1	170	98	126	7,14	14,6
										0,2	191	119	165	7,16	15,2
66	2040	65,9	12	7,06	117	1,78	14,8	7,25	11,6	0,1	163	46	39,5	7,3	16,5
										0,2	178	51	52	7,36	14,2
67	2340	66,2	11	9,98	47,2	0,71	6,5	7,4	14,4	0,1	47,4	0,2		7,6	14,2
										0,2	50	1,8		7,5	10,4
68	1926	48	5,06	2,29	32	0,67	13,2	7,36	11,3	0,2	139	107	335	7,25	14,4
										0,4	114	82	256	7,38	14,6

In meinen Versuchen steigerte das Adrenalin in 13 Fällen die Zuckerbildung im hohen Grade, 36 bis 456 Proz.

Anfangs injizierte ich 0,5 bis 1,0 mg Adrenalin in eine Blutmenge von 250 ccm, benutzte also eine Verdünnung von 1 : 250000 bis 500000. In den weiteren Versuchen stellte es sich aber heraus, daß schon 0,1 bis 0,2 mg (1 : 1,25 bis 2,5 Millionen) genügen.

Die Adrenalinwirkung blieb natürlich in den Versuchen, in denen die Leber kein Glykogen enthielt, daher auch keinen Zucker bildete, und außer diesen noch in fünf Versuchen (23, 26, 28, 37, 67) aus. In diesen Versuchen war aber das p_H des Blutes 7,6 bis 7,8, also viel alkalischer als in den Versuchen von positiven Resultaten (p_H 6,8 bis 7,4). Die Alkalose des Blutes hemmt also die Wirkung des Adrenalins.

In den meisten der Versuche (30, 35, 36, 38, 55, 63, 66, 68) steigert das Adrenalin gleichzeitig auch die Säurebildung, deshalb mußte in der Adrenalinperiode der Zufluß der Lauge beschleunigt werden, wenn dies aber nicht geschah, verringerte sich das p_H. Vor der Adrenalinperiode waren in der Regel zwei normale Perioden, in der Tabelle ist der Laugenverbrauch der zweiten normalen Periode angegeben.

Diese gesteigerte Säurebildung konnte nicht eine Gefäßverengerung und die damit verbundene langsamere Strömung verursachen, denn das Manometer, welches in den Apparat eingeschaltet war, zeigte nach der Adrenalininjektion keine Erhöhung des Druckes. Aller Wahrscheinlichkeit nach steigert das Adrenalin die Säurebildung direkt. Dies zeigen die Versuche von *Elias* und *Sammartino* (18), die wahrnahmen, daß die Adrenalineinspritzung den Milchsäuregehalt der Leber auf das Drei- bis Vierfache erhöht. Ferner beobachteten *Gigon* (19) und andere bedeutende Acidose nach Adrenalininjektion; diese Acidose wird in erster Reihe durch die gesteigerte Säurebildung der Leber verursacht, wobei *Gottschalk* und *Pohle* (20) angaben, daß das p_H des Blutes der V. hepatica parallel mit der Steigerung die Zuckerbildung verringert. Die gesteigerte Säurebildung fördert nämlich die zuckermobilisierende Wirkung des Adrenalins. Nach *Fröhlich* und *Pollak* (21) wird die Adrenalinwirkung an isolierten Froschlebern durch Säurezusatz verstärkt, durch Alkali gehemmt. Gleichermaßen beobachteten *Underhill, McDonell* (22) und viele andere, daß eine Injektion von $NaHCO_3$ oder Na_2HPO_4 sowohl bei Tieren als auch bei Menschen die Adrenalinhyperglykämie hemmt.

Nach der allgemeinen Auffassung ist die gesteigerte Säurebildung nicht die Ursache der Zuckermobilisierung, sondern eine der hauptsächlichsten Bedingungen dieser. Weil das Optimum der Leberdiastase bei p_H 6,8 liegt, hingegen nimmt die Wirksamkeit der Diastase bei p_H 7,8 so stark ab, daß die Adrenalinwirkung darum nicht zum Vorschein treten kann.

Meine Versuche mit Insulin (Tabelle IV) erreichten das erwartete Resultat nicht, ich nahm die Verringerung der Zuckerbildung in der Leber in keinem Falle wahr, als ich dem durchströmenden Blute 2 bis 10 Einheiten Insulin zugab. Von neun Versuchen veränderte sich die Zuckerbildung in sechs Fällen nur innerhalb normaler Grenzen. In drei Versuchen steigerte sich die Zuckerbildung bedeutend.

Dasselbe beobachteten an Hundelebern auch *Bornstein* und *Griesbach* (11). Aus diesem negativen Resultate darf aber nicht der Schluß gezogen werden, daß das Insulin an Lebern der Säugetiere die Glykogen-

Tabelle IV.

Versuch	Gewicht der Kaninchen	Gewicht der Leber	Glykogen		Normal			Insulin			Adrenaliin					Abnahme der Säurebildung
Nr.			vor dem Versuch	nach dem Versuch	Zucker pro 10 Min. mg	p_H	0,15 n NaOH pro 30 Min.	Zucker pro 10 Min. mg	p_H	Lauge pro 30 Min.	Dosis mg	Zucker pro 10 Min.	Zunahme	p_H	Lauge pro 30 Min.	Proz.
40	2810	66	3,68	0,51	68,3	6,96	8,4	62,2	6,99	7,2						
								54,3	7,08	6,1						27,4
42	2150	58,5	5,26	3,27	29	7,1	8,4	26	7,2	9,6						
								32	7,4	6,8	1	28	− 4	7,4	9,0	19
43	2230	51,5	5,97	0,53	51	7,2		72	7,3							
								64,4	7,1		1	21,2	− 43,2	6,9		
70	3040	118,8	6,71	6,10	100	7,30	19,7	110	7,36	15,0						
								125	7,26	9,9	0,1	124	− 1	7,26	9,6	49,7
											0,2	126	− 2	7,26	9,9	
71	2100	63	3,56	0,82	100	7,28	19,5	190	7,22	12,0						
								205	7,26	9,7	0,1	188	− 17	7,22	8,2	50,05
											0,2	154	− 51	7,25	8,2	
											0,4	180	− 25	7,20	10,0	
72	1750	41	4,83	2,0	142	7,2	8,1	151	7,3	6,3	0,1	108	− 43	7,22	6,0	22,2
								100	7,2	6,4	0,2	95	− 5	7,2	8,5	
73	1750	38	4,42	3,4	51	7,21	16,5	108	7,26	10,5						
								120	7,28	5,7	0,2	78	− 42	7,36	8,4	65,5
											0,4	81	− 39	7,4	4,5	
74	1575	24	1,0	0,2	30	7,3	19,2	42	7,2	9,0						
								35	7,23	7,5	0,2	43	+ 8	7,25	6,0	62
75	2830	67,3	4,95	3,58	94	7,25	15,0	89	7,32	6,6	0,2	100	+ 11	7,25	7,5	56

hydrolyse nicht hemmt, denn es ist höchst unwahrscheinlich, daß die Wirkung eines Hormons beim warmblütigen und poikilothermen Tiere so verschieden wäre, bei letzteren ist aber die hemmende Wirkung des Insulins unzweifelhaft bewiesen (1).

Der Grund des negativen Resultats ist darin zu suchen, daß man mit der angewandten Versuchseinrichtung die Vitalität der Kaninchenleber nicht völlig aufrecht halten kann. Dieses bezeugt auch diejenige Versuchsreihe, in denen ich die Kaninchenleber mit 1, 2, 3 Proz. Glucose haltendem Blute durchströmen ließ, konnte aber die Glykogensynthese nicht einmal erreichen. Es ist schon von *Barrenscheen* (7) festgestellt worden, daß die Kaninchenleber sich für solche Versuche viel weniger eignet als die Leber des Hundes, da erstere im überlebenden Zustande ihre Glykogenbaufähigkeit viel früher verliert. Aller Wahrscheinlichkeit nach hängt diejenige Funktion, welche die Glykogenhydrolyse hemmt mit derjenigen eng zusammen, welche die Glykogensynthese durchführt. Und wenn die Leber diese letztere Fähigkeit verlor, besitzt sie auch die erstere nicht mehr. Beide hängen mit der Vitalität der Leber eng zusammen und beide gehen während der Durchströmung rasch verloren.

Deshalb kann das Insulin an Kaninchenleber weder die Glykogenhydrolyse hemmen, noch die Synthese steigern. An der viel unempfindlicheren Froschleber und nach *Bindis* (9) Versuchen an der Hundeleber kann diese Wirkung des Insulins ohne Zweifel bewiesen werden.

Obwohl meine Versuche in dieser Hinsicht negatives Resultat hatten, gelang es, an überlebenden Kaninchenlebern zwei wichtige Insulinwirkungen nachzuweisen.

1. *Das Insulin hemmt die Säurebildung der Leber.* Den in der Tabelle IV zusammengestellten Insulinversuchen gab ich in der Regel nach zwei normalen Perioden der durchströmenden Flüssigkeit Insulin zu, in die Tabelle wurde aber nur die zweite normale Periode aufgenommen, in welcher die Säurebildung — gemessen mit der Quantität der verbrauchten Lauge — diejenige Stufe erreichte, welche sie in den übrigen Perioden zu behalten pflegte. Auf die Wirkung des Insulins verringert sich aber die Säurebildung rasch, und während der Insulinperiode wurde regelmäßig ein halbmal soviel Säure gebildet als normal. Dies zeigt auch Abb. 2.

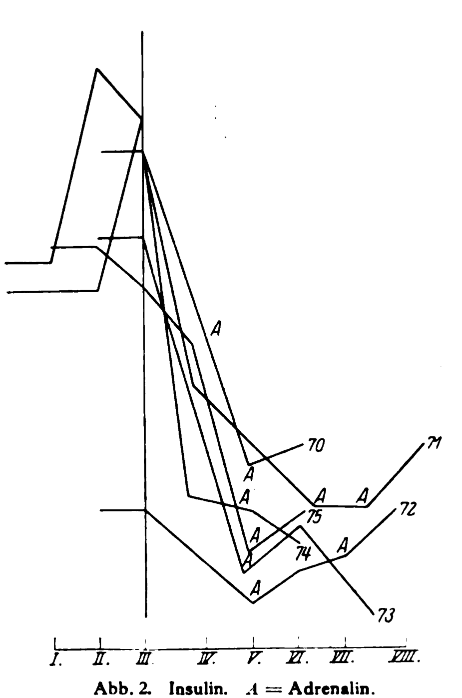


Abb. 2. Insulin. A = Adrenalin.

Da aus den Versuchen von *Gottschalk* (13) schon bekannt ist, daß das Insulin die Oxydationen (die Acetaldehydbildung) in der Leber steigert, müssen wir für wahrscheinlich halten, daß es diese hemmende Wirkung auf die Säurebildung durch eine raschere Oxydation der entstehenden Säuren erreicht.

Mit diesem Resultat stehen die Aufhebung der Acidose diabetischer Kranke durch Insulin und die Hemmung der Säurebildung der Muskeln in Einklang.

2. *Das Insulin hemmt die Zuckermobilisierung des Adrenalins.* Aus acht Versuchen nahm die Zuckerbildung der Leber nach Adrenalininjektion nur in zwei zu und auch dann nur unbedeutend mit 8 bis 11 mg = 22,4 bis 12,6 Proz.; also in viel geringerem Grade als bei normaler Leber. In den anderen sechs Versuchen ließ das Adrenalin die Zuckerbildung nicht nur ungesteigert, sondern hemmte dieselbe, in zweien (Nr. 42, 70) unbeträchtlich und in vieren (Nr. 43, 71, 72, 73) sehr stark. Diese Verringerung war in den vier Versuchen 42 bis 51 mg = 35 bis 67 Proz.

Das Insulin wirkte auch der säurebildungfördernden Wirkung des Adrenalins gegenüber antagonistisch. Das Adrenalin konnte nämlich die durch Insulin verminderte Säurebildung überhaupt nicht oder nur in einem sehr kleinen Grade steigern. Da aber bei der zuckermobilisierenden Wirkung des Adrenalins es eine wichtige Bedingung ist, daß durch Steigerung der Säurebildung ein entsprechendes Milieu zur optimalen Funktion der Leberdiastase hergestellt werde, ist es unzweifelhaft, daß das Insulin die zuckermobilisierende Wirkung des Adrenalins auch durch diese Verhinderung der Acidose hemmt.

Diese Versuche beweisen also, daß Adrenalin und Insulin betreffs ihrer Wirkungen auf den Stoffwechsel wahre Antagonisten sind.

Zusammenfassung.

Die beschriebene Versuchseinrichtung ermöglicht, daß man die Zucker-, Säuren- und CO_2-Bildung der überlebenden Kaninchenleber gleichzeitig beobachten kann.

Die glykogenreiche Leber bildet während der Durchströmung eine beträchtliche Menge von Zucker und Säuren, letztere muß man aber dadurch, daß man der durchströmenden Flüssigkeit Lauge beimengt, neutralisieren, sonst kann das p_H des Blutes auch auf 6,0 heruntersinken.

Das Adrenalin fördert die Zucker- und Säurebildung, die erstere Wirkung kommt aber nur dann zur Geltung, wenn das p_H des Blutes unter 7,5 ist.

An durchströmten Kaninchenlebern konnte mit Insulin weder Glykogensynthese noch eine Verminderung der Zuckerbildung erreicht werden.



Das Insulin vermindert die Säurebildung der Leber, und zwar wahrscheinlich dadurch, daß es die Oxydation der gebildeten Säure fördert.

Das Insulin hemmt beide Wirkungen des Adrenalins, da dieses weder die Zucker- noch die Säurebildung der Leber in Gegenwart von Insulin steigern kann.

Literatur.

1) *Issekutz*, diese Zeitschr. **147**, 264, 1924. — 2) *C. F. Cori* u. *G. T. Cori* und *Goltz*, Journ. Pharm. and exper. Therap. **22**, 355, 1923; *Cori*, *Cori* und *Pucher*, ebendaselbst **21**, 377, 1923; *C. F. Cori*, ebendaselbst **25**, 1, 1925. — 3) *Frank*, *Hartmann* und *Nothmann*, Klin. Wochenschr. **4**, 1067, 1925. — 4) *Grevenstuk* und *Laqueur*, diese Zeitschr. **178**, 283, 1926. — 5) *MacLeod*, *Noble* und *O. Brien*, Transact of the roy. soc. of Canada sect **5**, 129, 1924. — 6) *Grube*, Pflügers Arch. **107**, 490, 1905; **118**, 1, 1907. — 7) *Barrenscheen*, diese Zeitschr. **58**, 277, 1914. — 8) *Bernhard*, ebendaselbst **157**, 396, 1925. — 9) *Bindi*, Arch. di Fisiolo **23**, 99, 1925. — 10) *Lesser* und *Oppenheimer*, Handb. d. Biochem. IX, **223**, 1925. — 11) *Bornstein* und *Griesbach*, Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **43**, 371, 1924. — 12) *Ahlgreen*, Skand. Arch. f. Phys. **44**, 167, 1923; Klin. Wochenschr. **3**, 667, 1924. — 13) *Gottschalk*, diese Zeitschr. **155**, 348, 1925. — 14) *Skramlik*, Pflügers Arch. **180**, 1, 1920. — 15) *Mislowitzer*, diese Zeitschr. **159**, 72, 1925. — 16) *Masing*, Arch. f. exper. Pharm. **69**, 431, 1912. — 17) *Abelin*, diese Zeitschr. **74**, 248, 1916. — 18) *Elias* und *Sammartino*, ebendaselbst **117**, 10, 1921. — 19) *Gigon*, Zeitschr. f. exper. Med. **44**, 107, 1924. — 20) *Gottschalk* und *Pohle*, Arch. f. exper. Pharm. **95**, 65, 1922. — 21) *Fröhlich* und *Pollak*, ebendaselbst **77**, 265, 1914. — 22) *Underhill* und *McDonell*, Journ. of biol. Chem. **25**, 463, 1916; **29**, 245, 1917.

Einfache Methode zur Bestimmung der Glucose in Mengen von 1 bis 15 mg.

Von

B. v. Issekutz und **J. v. Both.**

(Aus dem pharmakologischen Institut der Kgl. Ungarischen Universität in Szeged.)

(Eingegangen am 17. Januar 1927.)

Zur Bestimmung der Glucose in einer Quantität über 10 mg stehen uns viele verläßliche Methoden zur Verfügung; gleicherweise wurden in den letzten Jahrzehnten zahlreiche Mikromethoden zur Bestimmung des Blutzuckers ausgearbeitet. Zwischen der Leistungsfähigkeit der Makro- und Mikromethoden gibt es aber ein Gebiet, nämlich die Bestimmung der Zuckerquantität von 1 bis 10 mg, welche, obwohl wir dessen öfters bedürfen, Schwierigkeiten trifft und wir dazu keine entsprechenden Methoden haben.

Es wurde öfters versucht, die Methode von *Bertrand* zur Bestimmung der Glucosemenge unter 10 mg für geeignet zu gestalten. So brachten *Möckel* und *Frank* mit der Zugabe von 10 mg Glucose den Zuckergehalt der Lösung in ein Gebiet, welches zur Glucosebestimmung geeignet ist. *Irene Greiner*[1]) strebte, den ungestörten Verlauf der Reaktion bei weniger als 10 mg Zucker durch Zugabe von Na_2CO_3 und $NaOH$ zu erreichen. Wir hielten es für zweckmäßiger, anstatt die Leistungsfähigkeit der Makromethode nach abwärts auszubreiten, das Gebiet der gut bewährten Mikromethoden durch eine Erhöhung der Konzentration der angewandten Reagenzien nach aufwärts zu steigern.

Unsere Wahl traf die Methode von *Hagedorn-Jensen*[2]), da wir uns überzeugten, daß diese bedeutend einfacher und bequemer ist als die *Bang*sche und dabei bei geringerer Vorsicht genauere Resultate gibt.

Bei der Anwendung der *Hagedorn-Jensen*schen Methode wird zur Oxydation der Glucose Kaliumferricyanid angewendet: 12 ccm der Glucoselösung werden mit 2 ccm 0,005 n Kaliumferricyanid, welche

[1]) Diese Zeitschr. **128**, 274, 1922.
[2]) Ebendaselbst **135**, 461, 1923.

auch 0,2 n Na_2CO_3 enthält, in einem Wasserbad 15 Minuten lang gekocht. Das entstandene Kaliumferrocyanid wird mit Zinksulfat ausgefällt, mit Essigsäure angesäuert und das Jod, welches aus JK durch das überflüssig gebliebene Ferricyanid entsteht, wurde mit 0,005 n Natriumthiosulfat titriert.

Mit Hilfe einer Tabelle erhält man aus der Quantität des verbrauchten 0,005 n Natriumthiosulfats die Quantität des vorhandenen Zuckers.

0,01 ccm	entsprechen	0,382 mg	Glucose,
1,99 „	„	0,002 „	„

Dies sind die Grenzen der Anwendbarkeit dieser Methode.

Wenn man die Konzentration der Kaliumferricyanid- und Natriumthiosulfatlösungen auf das Zehnfache steigert, also mit 0,05 n Lösungen arbeitet und 10 bis 10 ccm zur Bestimmung verwendet, so ist auch die Bestimmung von 10 mg Zucker möglich.

Vor allem stellten wir fest, daß zur Titrierung von 10 ccm 0,05 n Kaliumferricyanids in der Anwesenheit von 10 ccm Jodkaliumzinksulfatlösung genau 10 ccm 0,05 n Thiosulfat notwendig sind. Das Resultat bleibt auch dann unverändert, wenn man die Kaliumferricyanidlösung vorher 10 bis 20 Minuten hindurch in einem heißen Wasserbad wärmt.

Folgende Aufgabe war die Bestimmung der Konzentration der angewendeten Laugen und die der Kochzeit. Zu diesem Zwecke kochten wir je 5 ccm 0,1 proz. Glucoselösung mit 15 ccm Wasser und 10 ccm 0,05 n Kaliumferricyanid, welche in 1 Liter 5 g Na_2CO_3 enthält, in einem Wasserbad 10, 15, 20, 30 Minuten hindurch; nach Abkühlung gaben wir 10 ccm JK-Zinksulfatlösung und 5 ccm 0,5 n Essigsäure hinzu und titrierten mit 0,05 n Thiosulfat.

Die Quantität des verbrauchten Kaliumferricyanids war mittelwertig, nach je drei Bestimmungen nach dem Kochen von

10	15	20	30	45 Minuten
3,20	3,29	3,51	3,75	3,80 ccm.

Es steigerte sich also die Quantität des reduzierten Kaliumferricyanids während des Kochens bedeutend. Wenn wir aber die Quantität des Natriumcarbonats erhöhten, hatte die Kochzeit einen viel geringeren Einfluß. Wir ließen z. B. 5 ccm einer 0,1 proz. Glucoselösung mit 15 ccm Wasser und 10 ccm 0,05 n Kaliumferricyanid, welche in einem Liter 17 g Na_2CO_3 enthielt, 15, 20, 30 Minuten lang sieden.

Die Quantität des reduzierten Kaliumferricyanids war nach

10	20	30 Minuten,
2,98	3,00	3,04 ccm.



Während der weiteren Versuche stellte es sich heraus, daß das Resultat um so genauer und regelmäßiger ist, je größer der Na_2CO_3-Gehalt der Lösung war und daß dabei ein Kochen von 20 Minuten vollständig genügt.

Die endgültige Form der Methode bestimmten wir folgendermaßen:

Notwendige Lösungen:

1. 0,05 n Kaliumferricyanidlösung, 16,5 g Kaliumferricyanid und 70 g Natriumcarbonat in 1000 ccm Wasser gelöst.
2. Jodkaliumzinksulfatlösung, 10 g Zinksulfat, 50 g Natriumchlorid und 5 g Kaliumjodid in 200 ccm Wasser gelöst.
3. 9proz. Essigsäurelösung.
4. 0,05 n Natriumthiosulfatlösung.
5. 1 Proz. Amylum solub. in gesättigter NaCl-Lösung gelöst.

Man bringt die Zuckerlösung in einen 100-ccm-Erlenmeyerkolben, ergänzt das Volumen auf 20 ccm, gibt 10 ccm 0,05 n Kaliumferricyanid hinzu und kocht es 20 Minuten lang in einem Wasserbad. Nach der Abkühlung gibt man 10 ccm JK-Zinksulfatlösung hinzu, 10 ccm 9proz. Essigsäurelösung, einige Tropfen Stärke und titriert mit 0,05 n Natriumthiosulfat.

Gleichzeitig vollführt man eine Kontrollbestimmung ohne Zucker zur Feststellung des Titers der Kaliumferricyanidlösung. Die Differenz der beiden Bestimmungen ergibt die Quantität des reduzierten Kaliumferricyanids.

Um 15 Bestimmungen gleichzeitig ausführen zu können, verwende man ein Wasserbad von 40 cm Durchmesser und einen dazu passenden Kolbenbehälter. Dieser besteht aus drei scheibenförmigen Kupferplatten von 36 cm Durchmesser, welche an einer gemeinsamen zentrischen Säule befestigt sind. An der oberen Scheibe, welche heruntergenommen werden kann, befinden sich in zwei Kreisen zusammen 15 kreisförmige Löcher von 3 cm Durchmesser. An der mittleren und unteren Scheibe befinden sich, diesen Löchern entsprechend, je 15 kreisförmige Ausschnitte, an der mittleren von 6 cm, an der unteren von 4 cm Durchmesser. In diese Löcher werden 15 Stück Erlenmeyerkolben in zwei Reihen, in der Art der Probierröhren, placiert und mit der oberen Scheibe, durch dessen Öffnungen die Hälse herausreichen, befestigt.

Wir verfertigten aus *Merck*scher ,,Glucose pro analyse“ nach dem Austrocknen im Vakuum 0,1proz. Lösung, deren Glucosegehalt mit den Methoden von *Bertrand* und *Willstätter* kontrolliert wurden. Aus dieser Lösung stellten wir mit Hilfe kalibrierter Pipetten und Meß-



Tabelle I.

Glucose mg	0,05n Ferricyankalium 1	2	3	4	5	6	7	8	9	Mittelwert	Abweichung vom Mittelwert		Differenz	Nach der Tabelle II berechnet	Differenz
1	0,70	0,70	0,70	0,65	0,65	0,70	0,70	0,70	0,70	0,69	+ 0,01	— 0,04	0,05	1,000	0,000
2	1,30	1,35	1,33	1,32	1,30	1,30	1,28	1,27	1,25	1,30	+ 0,05	— 0,03	0,08	2,000	0,000
3	1,92	1,92	1,95	1,95	1,94	1,94	1,94	1,95	1,95	1,94	+ 0,01	— 0,02	0,03	3,004	+ 0,004
4	2,55	2,56	2,56	2,52	2,55	2,60	2,54	2,56	2,56	2,555	+ 0,045	— 0,035	0,08	3,996	— 0,004
5	3,15	3,23	3,23	3,15	3,15	3,17	3,16	3,15	3,16	3,17	+ 0,05	— 0,02	0,07	4,999	— 0,001
6	3,75	3,70	3,72	3,75	3,75	3,70	3,74	3,74	3,73	3,73	+ 0,02	— 0,03	0,05	6,011	+ 0,011
7	4,32	4,32	4,38	4,38	4,35	4,40	4,40	4,36	4,34	4,36	+ 0,04	— 0,04	0,08	7,002	+ 0,002
8	4,95	5,00	5,00	5,00	4,90	4,95	5,00	4,96	4,98	4,97	+ 0,03	— 0,02	0,05	8,009	+ 0,009
9	5,52	5,52	5,55	5,65	5,65	5,55	5,55	5,58	5,56	5,57	+ 0,08	— 0,05	0,13	9,009	+ 0,009
10	6,13	6,17	6,15	6,14	6,15	6,19	6,15	6,16	6,20	6,16	+ 0,03	— 0,03	0,06	9,992	— 0,008
11	6,70	6,75	6,75	7,76	6,75	6,75	6,74	6,73	6,75	6,74	+ 0,02	— 0,04	0,06	10,992	— 0,008
12	7,30	7,26	7,30	7,26	7,35	7,25	7,28	7,30	7,30	7,30	+ 0,05	— 0,05	0,10	12,000	0,000
13	7,90	7,85	7,80	7,90	7,88	7,82	7,85	7,85	7,80	7,85	+ 0,05	— 0,05	0,10	13,005	+ 0,005
14	8,40	8,50	8,42	8,45	8,40	8,40	8,42	8,38	8,42	8,42	+ 0,08	— 0,04	0,12	14,004	+ 0,004
15	9,05	9,00	9,00	9,04	8,96	9,05	9,00	8,98	9,00	9,01	+ 0,03	— 0,03	0,06	15,007	+ 0,007

Tabelle II.

$K_3Fe(CN)_6$ ccm	Glucose in mg 0,0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9
0	—	—	—	—	—	0,725	0,87	1,015	1,18	1,34
1	1,51	1,67	1,83	2,00	2,16	2,31	2,47	2,62	2,78	2,94
2	3,10	3,26	3,42	3,58	3,74	3,90	4,06	4,22	4,38	4,54
3	4,72	4,88	5,04	5,20	5,36	5,53	5,70	5,96	6,03	6,20
4	6,37	6,54	6,71	6,88	7,05	7,22	7,39	7,55	7,72	7,89
5	8,06	8,22	8,39	8,56	8,72	8,89	9,06	9,22	9,39	9,55
6	9,72	9,89	10,06	10,23	10,41	10,58	10,75	10,92	11,10	11,28
7	11,46	11,54	11,72	12,00	12,18	12,36	12,54	12,73	12,91	13,10
8	13,28	13,46	13,63	13,80	13,97	14,14	14,31	14,49	14,66	14,83
9	14,99	—	—	—	—	—	—	—	—	—

kolben die entsprechenden Verdünnungen her, und zwar so, daß 20 bis 20 ccm Lösungen 1 bis 15 mg Glucose enthalten sollen.

Wir vollzogen in drei Versuchsreihen je drei Bestimmungen und faßten diese in der Tabelle I zusammen. Die Bestimmungen geben gut übereinstimmende Resultate, die Abweichung von dem aus den neun Versuchen berechneten Mittelwert ist durchschnittlich 0,05 ccm, die Differenz der größten und kleinsten Werte ist mittelwertig 0,07 ccm.

Aus den Angaben dieser Tabelle berechneten wir mit der Methode der kleinsten Quadrate die Tabelle II, welche die dem verbrauchten Kaliumferricyanid entsprechenden Glucosemengen angibt.

Wir verwenden diese Methode seit zwei Jahren zur Bestimmung des Glucosegehalts von solchem Blute, welches isolierte Organe durchströmt. Zu diesem Zwecke verdünnen wir 5 ccm Blut in einem Meßkolben von 50 ccm mit Wasser und geben wegen des Enteiweißens 3 bis 5 ccm 5proz. Lösung von Natriumwolframat und ebensoviel $^2/_3$ n H_2SO_4 hinzu und führen die Zuckerbestimmung an 10 bis 20 ccm Proben des Filtrats durch. Gleichzeitig bestimmen wir an Leerproben den Titer des Kaliumferricyanids und durch Subtrahieren beider Werte erhalten wir die Quantität des reduzierten Kaliumferricyanids. Den Zuckergehalt des Blutes berechnen wir mit Hilfe der mitgeteilten Tabellen.

Die Methode ist, wie es unsere Erfahrungen von 2 Jahren zeigen, genügend verläßlich, ergibt übereinstimmende Resultate; es hat alle diejenigen Vorzüge, welche die *Hagedorn-Jensen*sche Mikromethode so sehr auszeichnen und beliebt machen: Geschwindigkeit, Einfachheit und daß kleinere Veränderung der Bestimmungsumstände das Resultat nicht beeinflußt.

Über die Hydrolyse des Seidenfibroins[1]) mittels 25proz. Ameisensäure.

Von

N. D. Zelinsky und **K. P. Lawrowsky.**

(Aus dem organisch-chemischen Laboratorium der I. Universität Moskau.)

(Eingegangen am 19. Januar 1927.)

Vor etwa 3 Jahren[2]) machten *Zelinsky* und *Ssadikow* die Beobachtung, daß Gelatine beim Auflösen in 50proz. Ameisensäure selbst bei längerem Kochen nicht vollständig zerfällt, indem das Hydrolysat nicht aufhört die Biuretreaktion zu geben. Die Menge des NH_2-Stickstoffs in der Lösung beträgt 25,46 Proz., während beim Kochen einer Gelatinelösung mit Schwefelsäure das Hydrolysat 71 Proz. nach *Sörensen* titrierbaren Stickstoffs enthält.

Es stellte sich ferner heraus, daß 10proz. Ameisensäure bei 180° (bei nur dreistündigem Erhitzen) Gelatine in ein abiuretes Hydrolysat verwandelt; dessen ungeachtet enthält letzteres nur 33,1 Proz. NH_2-Stickstoff. Ähnliche Resultate wurden bei der Bearbeitung von Seide, Casein und Gänsefedern mit 10proz. Ameisensäure erzielt. Aus diesen Daten könnte man den Schluß ziehen, daß Ameisensäure zur Hydrolyse von Eiweißstoffen nicht geeignet ist, und hauptsächlich deshalb, daß sie eine Maskierung der NH_2-Gruppen hervorruft, wobei wahrscheinlich Kondensationsprodukte der Aminosäure gebildet werden. Bei der näheren Untersuchung eines Gelatinehydrolysats wurden auch wirklich in Alkohol und Äther lösliche sirupartige Produkte gefunden, aus denen die Aminosäuren sich durch nachträgliche Hydrolyse mittels Salzsäure nicht ausscheiden ließen. Hieraus wurde daher die Schlußfolgerung gezogen, daß bei der Hydrolyse von Eiweißstoffen unter Druck (im Autoklaven) mittels 10proz. Ameisensäure die nächsten Zerfallsprodukte der ersteren, die Peptide und Anhydride der Amino-

[1]) Steam Filature Japan Raw Silk Meikyosha.
[2]) Diese Zeitschr. 137, 397, 1923.

säuren, sich unter dem Einfluß der Ameisensäure kondensieren und sich der weiteren hydrolysierenden Wirkung derselben entziehen.

Die vorliegende Arbeit hat eben den Zweck festzustellen, ob in der Tat eine solche Folgerung richtig ist, oder doch vielleicht Ameisensäure, in *anderen Konzentrationen* angewandt, analog den Mineralsäuren. imstande wäre die Hydrolyse zu Ende zu führen.

100 g Seidenfibroin wurden, nach vorheriger Entleimung durch Erwärmung mit Wasser unter schwachem Druck, mittels 25proz. Ameisensäure im Autoklaven bei 180° und 10 Atm. Druck im Laufe von 3 Stunden hydrolysiert.

Alles ging in Lösung über, Farbe hellorange, Biuretreaktion negativ, Ninhydrinreaktion positiv.

2 ccm des Hydrolysats enthalten nach *Kjeldahl* 0,04265 g, gleich 100 Proz., nach *Sörensen* 0,02751 g, gleich 64,49 Proz. Stickstoff.

Solch ein Verhältnis zwischen Amino- und Gesamtstickstoff (sehr nahe Werte erhielten wir auch bei der Hydrolyse der Seide mittels verdünnter Mineralsäuren, nicht schwächer als 4 bis 5 Proz.) weist darauf hin, daß bei der Druckhydrolyse des Seidenfibroins mittels 25proz. Ameisensäure keine Kondensation der Produkte der Hydrolyse stattfindet, wie sie *Zelinsky* und *Ssadikow* bei Gelatine und 10proz. Ameisensäure beobachteten; es geht hierbei vielmehr eine normale Hydrolyse vor sich, wie bei der Hydrolyse mittels Mineralsäuren.

Die Hauptmenge der Ameisensäure wurde im Vakuum abgetrieben. Nach Entfernung der Ameisensäure wurde das Hydrolysat mit heißem Wasser verdünnt. Aus der im Vakuum nochmals konzentrierten Lösung fiel ein kristallinischer Niederschlag aus. Letzterer wurde aus heißem Wasser umkristallisiert, wobei 10 g Kristalle erhalten wurden; Schmelzpunkt 312 bis 316° unter Zersetzung. Die Substanz wies eine positive Reaktion von *Millon* auf.

0,1500 g Substanz enthalten 0,01147 g Stickstoff nach *Kjeldahl*. Für Tyrosin ($C_9H_{11}NO_3$) ber. 7,73 Proz., gef. 7,65 Proz. N.

Das Hydrolysat wurde, nach Entfernung des Tyrosins, bis zum Verschwinden der *Millon*schen Reaktion, im Extraktionsapparat von *Maassen* mit Äther extrahiert, was 2 Wochen dauerte. In den Auszug ging außer einer geringen Menge Ameisensäure nichts über.

Auch bei darauffolgendem Extrahieren mit Chloroform und Äthylacetat ging in den Auszug nichts über.

Würde die Ameisensäure unter den Bedingungen unserer Hydrolyse reduzierend wirken, so könnte man unter den Produkten der Hydrolyse die Bildung von Basen (Piperazinen) erwarten. Behufs Bestimmung der Basen wurde ein Teil des Hydrolysats auf Zusatz von KOH bis zur stark alkalischen Reaktion der Destillation mit Wasserdampf

unterworfen, wobei die Basen in mit Salzsäure angesäuertem Wasser aufgefangen wurden.

Das Destillat (1½ Liter) wurde auf dem Wasserbad eingeengt und im Vakuumexsikkator getrocknet. Der getrocknete Rückstand wurde mit absolutem Alkohol extrahiert.

Der in Alkohol unlösliche Teil besteht aus Chlorammonium, dessen Menge bedeutend größer war, als die des in Alkohol löslichen Salzes der Base.

Die alkoholische Lösung dieses Salzes wurde eingeengt und dann das Chloroplatinat dargestellt, dessen Analyse ergab: 0,4144 g Substanz enthalten 0,1722 g Platin. Für $(CH_3NH_2HCl)_2PtCl_4$ ber. 41,58 Proz., gef. 41,55 Proz. Pt.

Somit gingen mit dem Wasserdampf NH_3 und Methylamin über; Piperazin wurde nicht gefunden. Die Bildung des Methylamins ist hier eine Folge der bekannten Reaktion, die beim Erwärmen von Aminosäuren mit starkem Alkali stattfindet; das Methylamin entstand auf Kosten des in geringer Menge zerfallenden Glykokolls, während das NH_3 als Resultat der Desamidierung der Aminosäuren unter dem Einfluß des andauernden Erwärmens mit starkem Alkali gebildet wurde.

Der mit Alkali nicht behandelte Teil des Hydrolysats (eine Hälfte des Ganzen) wurde im Vakuum (10 bis 12 Millimeter) bei 40^0 bis zur Trockne eingedampft. Auf Zusatz von absolutem Alkohol ging ein ganz unbedeutender Teil der Substanz in Lösung über, während die Hauptmasse sich in Form eines weißen kristallinischen Produkts ausschied. Dasselbe wurde abfiltriert, im Vakuumexsikkator getrocknet und dann mit absolutem Alkohol extrahiert. Es ging hierbei ein ganz kleiner Teil in Lösung über, der aus einem Öl besteht, das die Pyrrolreaktion gibt; ein Hinweis darauf, daß das Prolin ein Produkt der Hydrolyse von Leimspuren ist, die im Seidenfibroin zurückblieben.

Der in Alkohol unlösliche Teil wurde aus Wasser umkristallisiert. Es wurden 28 g eines weißen kristallinischen Produkts gewonnen, das süß und in Wasser gut löslich war; es gab eine starke Ninhydrinreaktion.

Zu 15 g dieser Substanz wurde absoluter Alkohol zugesetzt und die Aminosäuren wie üblich esterifiziert. Das Reaktionsprodukt wurde im Vakuum (12 mm) bei 40^0 eingeengt, und zwar bis zu zwei Drittel des ursprünglichen Volumens. In der Kälte fielen reichlich Kristalle (Chlorhydrat des Glykokollesters) aus. Nach Umkristallisieren aus absolutem Alkohol war der Schmelzpunkt 143 bis 144^0.

In reinem Zustande wurden von dieser Substanz 9,8 g gewonnen; die Mutterlauge wurde wieder in konzentrierter Lösung esterifiziert und fand in der Kälte keine Ausscheidung der Kristalle mehr statt. Die Lösung wurde im Vakuum auf dem Wasserbad bis zur Trockne eingedampft und aus dem rückständigen Salze wurde der freie Ester

nach der Methode von *Zelinsky*[1]) isoliert: das Salz wurde mit frisch gefälltem und getrocknetem Bleihydroxyd vermengt; die Zersetzung wurde bei einer Temperatur des Ölbades von 180 bis 185° geführt; die Vorlage wurde durch ein Gemisch von Alkohol mit fester Kohlensäure gekühlt. Vom freien Ester der Aminosäure resultierten etwas mehr als 3 g. Der Ester wurde im Vakuum (12 mm), und zwar auf dem Wasserbad bei einer Temperatur von 49 bis 50°, d. h. bei der Siedetemperatur des Alanins rektifiziert.

Als Resultat der Untersuchung der Produkte der Hydrolyse ergaben sich somit: 10 g Tyrosin, was bei Umrechnung auf die verarbeitete Menge Seide 10 Proz. ausmacht; 9,8 g Chlorhydrat des Glykokollesters, was bei Umrechnung auf Glykokoll 34 bis 35 Proz. von der verarbeiteten Seide ausmacht (die Ausbeute an Chlorhydrat beträgt 70 bis 75 Proz. der Theorie) und 3 g Alaninester, was auf freies Alanin 20 Proz. ausmacht (wir rechnen die Ausbeute an Chlorhydrat des Alanins entsprechend 75 Proz. der Theorie und die Ausbeute an freiem Ester zu 50 Proz. der Theorie).

Die Ausscheidung der Aminosäuren aus dem Hydrolysat bietet keine Schwierigkeiten, da sie sich leicht reinigen lassen; das Hydrolysat ist nur schwach gelblich gefärbt. Diese Umstände, sowie die Abwesenheit von Anhydriden unter den beschriebenen Bedingungen der Hydrolyse, veranlassen uns auf die Hydrolyse der Proteine mittels wässeriger Lösung von Ameisensäure aufmerksam zu machen.

Daß die Anhydride der Aminosäuren mittels 25proz. Ameisensäure hydrolysiert werden, erhellt aus folgendem Versuch: 0,3586 g Glykokoll-Anhydrid (Diketopiperazin) wurden im Autoklaven mittels 25proz. Ameisensäure bei 180° im Laufe von 3 Stunden hydrolysiert. Das Hydrolysat wurde mit $Ba(OH)_2$ neutralisiert und in der neutralen Lösung der NH_2-Stickstoff ermittelt. An nach *Sörensen* titrierbarem Stickstoff wurde gefunden: 0,07781 g. Berechnet: 0,08806.

Mithin befindet sich der größte Teil des Stickstoffs in Form von NH_2-Gruppen. Das Verhältnis des Amino- zum Gesamtstickstoff beträgt 88,36 Proz.

Es wurde somit erörtert, daß durch die Autoklavenhydrolyse der Seide mittels 25proz. Ameisensäure dasselbe Resultat erzielt wird, wie mittels 4- bis 5proz. starker Mineralsäuren. Die in der Seide präexistierenden Anhydridformen können bei der Spaltung mittels 25proz. Ameisensäure nicht ausgeschieden werden, da sie bei solch einer Behandlung hydrolysiert werden.

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 73, 459, 1911.

Über den Chloridgehalt im Blute bei milchgebendem Vieh während des Melkaktes.

Von

A. Krestownikoff.

(Aus dem medizinisch-chemischen Institut, Lund.)

(Eingegangen am 19. Januar 1927.)

In einer von mir zusammen mit *Carlens* (1) ausgeführten Arbeit haben wir gezeigt, daß der Melkakt als solcher eine Senkung des Glykosegehalts des Blutes herbeiführt, die unter gewissen Umständen sehr beträchtlich werden kann. Die Entstehung dieser Hypoglykämie kann zufriedenstellend durch die Annahme erklärt werden, daß der Blutzucker die Muttersubstanz für die Lactose der Milch bildet, sowie daß der Melkakt eine temporäre Forcierung der Milchproduktion zur Folge hat. Der hierdurch entstandene erhöhte Verbrauch von Glykose sollte durch ein entsprechendes Einströmen von Glykose in das Blut nicht momentan kompensiert werden können. Hierdurch muß eine kurzdauernde Verminderung des Blutzuckergehalts zustande kommen.

Im Zusammenhang mit dieser Untersuchung hat mir Prof. *E. Widmark* vorgeschlagen, zu untersuchen, ob der Gehalt des Blutes an Chloriden während des Melkaktes eine Veränderung erleidet. Die Chloride sollen sich nämlich auf eine wesentlich andere Weise verhalten als die Glykose. Der Glykosegehalt des Blutes ist bei Kühen in der Regel niedriger als 0,1 Proz. und der Lactosegehalt der Milch erreicht ungefähr 5 Proz., woraus sich ergibt, daß bei der Milchbildung eine erhebliche Konzentration von Kohlehydraten stattfinden muß. Die Konzentration der Chloride im Blute ist aber drei- bis viermal so groß als in der Milch. Vergleicht man den Chloridgehalt des Plasmas mit dem der Milch, so wird die Differenz noch größer, da sich die Chloride hauptsächlich im Plasma und nicht in den Blutkörperchen vorfinden. Bei der Milchbildung muß also hier — verglichen mit den Kohlehydraten — eine ganz entgegengesetzte Erscheinung zu beobachten sein. Die Flüssigkeit, die die Milchdrüsen verläßt, ist in bezug auf die Chloride weniger konzentriert als das Blut und es muß demnach bei



der Milchbildung ein Hintanhalten dieser stattfinden. Außerdem besteht ein intimer Zusammenhang zwischen dem Gehalt an Chloriden im Blute und in der Milch (2, 3), indem bei einer Zunahme des Chloridgehalts im ersteren auch unmittelbar der Gehalt in letzterer steigt, eine Erscheinung, die an einen unvollständigen Diffusionsausgleich erinnert. Die Lactosekonzentration in der Milch scheint dagegen vom Blutzuckergehalt ziemlich unabhängig zu sein.

Aus diesen Gründen hat man daher nicht zu erwarten, daß der Chloridgehalt des Blutes auf die gleiche Weise wie der Glykosegehalt während Perioden mit erhöhter Tätigkeit der Milchdrüsen sinken wird. Es sollte eher das entgegengesetzte Verhältnis eintreffen. Ein gewisses Hintanhalten der Chloride des Plasmas bei gleichzeitiger Ausscheidung eines bedeutenden Teiles seines Wassers sollte eine Erhöhung des Chloridgehalts des Blutes herbeiführen können, wenn nicht ein Ausströmen von Chloriden in die Gewebe und in den Harn mit hinreichender Geschwindigkeit erfolgt.

Die Versuche wurden derart ausgeführt, daß Blutproben einer kleinen Ohrvene vor, während und nach dem Melken entnommen wurden. Das Melken geschah bei Kühen in der Regel mit der Maschine. Der Chloridgehalt wurde mit der Mikromethode von *Bang* bestimmt. Die Werte sind als Cl′ berechnet.

Um festzustellen, ob die Milchmenge durch die Irritation bei der Probenahme nicht wesentlich vermindert wurde, wurde die während des Versuchs erhaltene Milchmenge abgemessen und mit der Produktion der vorhergehenden Tage verglichen.

Aus den Versuchen mit Kühen (Tabelle I) ergibt sich, daß der Chloridgehalt durch den Melkakt keine wesentliche Veränderung erfährt. In gewissen Versuchen kann man aber eine ganz unbedeutende Tendenz zu einer Erhöhung des Chloridgehalts im Blute während des Melkaktes oder unmittelbar danach konstatieren. Diese Erhöhung überschreitet aber nur selten die Fehlergrenzen der Mikromethode. Vielleicht würde sich das regelmäßige Auftreten dieser Erscheinung durch eine genauere Methode feststellen lassen. Die Erhöhung ist aber so unbedeutend, daß der osmotische Druck des Blutes, der zum großen Teile durch die Chloride aufrechterhalten wird, keine wesentliche Erhöhung erleidet. Dies stimmt mit mehreren Beobachtungen anderer Untersucher, die den osmotischen Druck des Blutes bei Kühen unter verschiedenen physiologischen Verhältnissen gemessen haben (3, 4).

Auch bei der Ziege (Tabelle II) kann man die gleiche Erscheinung beobachten. In vier von den sechs ausgeführten Versuchen ist der Chloridgehalt während oder unmittelbar nach dem Melken höher als vor demselben.

Tabelle I.

Der Chloridgehalt des Blutes von Kühen unmittelbar vor, während und nach dem Melkakt.

Datum	Nr. des Tieres	Milchmenge in kg		Chloridgehalt in Prozenten				
		pro Tag	während des Versuchs	2 bis 5 Min. vor dem Melken	während des Melkens	3 bis 5 Min. nach dem Melken	6 bis 10 Min. nach dem Melken	10 bis 20 Min. nach dem Melken
4. X.	456	12	8	0,32	0,32	—	0,32	0,29
25. IX.	449	19,5	9	0,28	0,28	0,30	—	—
28. IX.	306	16	8,1	0,30	0,29	0,30	—	—
4. X.	449	19,5	10,5	0,27 *)	0,33	—	0,34	0,30
28. IX.	555	14,5	7,8	0,32	0,32	0,32	—	—
23. IX.	457	14,5	7,5	0,28	0,27	0,29	0,31	—
30. IX.	326	12	6,1	0,32	0,34	—	—	0,30
4. X.	491	11,5	6	0,29	0,29	—	—	0,31
30. IX.	555	14,5	5,2	0,30	0,31	0,32	—	—
30. IX.	502	18	5,1	0,29	0,28	—	—	0,29

*) 10 Min. vor dem Melken.

Tabelle II.

Der Chloridgehalt im Blute einer Ziege unmittelbar vor, während und nach dem Melkakt. Die Ziege wurde morgens und abends gemolken. Die obere Hälfte der Tabelle gibt die Resultate für das Morgenmelken, die untere die für das Abendmelken wieder.

Datum	Milchmenge ccm	Der Chloridgehalt im Blute in Prozenten		
		vor dem Melken	während des Melkens	5 bis 10 Minuten nach dem Melken
22. X.	1330	0,28	0,29	0,30
23. X.	1100	0,29	0,30	0,31
25. X.	1320	0,29	0,29	0,31
27. X.	1100	0,28	0,29	0,30
24. X.	820	0,30	0,29	0,30
27. X.	620	0,30	0,30	0,30

Literatur.

1) *O. Carlens* und *A. Krestownikoff*, diese Zeitschr. **181**, 176 bis 182, 1926. — 2) *W. Denis* und *W. Sisson*, Journ. of biol. Chem. **46**, 483 bis 492, 1921. — 3) *F. H. van der Laan*, diese Zeitschr. **71**, 289 bis 305, 1915. — 4) *Ch. Porcher*, Le Lait **8**, 11 bis 21, 1923.

Beitrag zur Kenntnis des oxydativen Abbaues der Glucose.

II. Mitteilung:

Über die Oxydation der Brenztraubensäure.

Von

B. Bleyer und W. Braun.

(Aus dem chemischen Institut der Hochschule für Landwirtschaft und Brauerei Weihenstephan.)

(Eingegangen am 20. Januar 1927.)

In den Untersuchungen über den oxydativen Abbau der Glucose[1]) mittels Chloramin in alkalischer Lösung wurde die Vermutung ausgesprochen, daß die Oxydation über die Brenztraubensäure verläuft. Die Brenztraubensäure selbst wurde dabei weder isoliert noch sonstwie nachgewiesen. Die Vermutung beruhte auf den experimentellen Tatsachen, daß 1 Mol Glucose 8 Äquivalente Sauerstoff verbraucht und quantitativ Essigsäure und Kohlensäure liefert. Wenn bei dieser Reaktion wirklich Brenztraubensäure als Zwischenprodukt auftritt, so muß die Reaktion vollständig gleichartig verlaufen, wenn man an Stelle der Glucose Brenztraubensäure selbst als Ausgangsmaterial in die Reaktion einführt. 1 Mol Brenztraubensäure müßte also bei der Oxydation mit Chloramin 2 Äquivalente Sauerstoff verbrauchen und 1 Mol Essigsäure und 1 Mol Kohlensäure liefern.

Die Untersuchungen wurden, abgesehen von einigen nebensächlichen Modifikationen, methodisch ganz gleich durchgeführt, wie bei der Glucose[1]). Sie zerfallen also im wesentlichen auch in drei Teile:

1. Jodometrische Messung des von 1 Mol Brenztraubensäure verbrauchten Sauerstoffs.
2. Acidimetrische Messung der entstandenen Essigsäure.
3. Acidimetrische Messung der entstandenen Kohlensäure.

Zunächst wurden die Reaktionsbedingungen (Reaktionszeit und Temperatur sowie Alkalität der Lösung) vollständig gleich eingehalten, wie bei der Oxydation der Glucose. Dabei zeigte sich, daß die Reaktion

---

[1]) Diese Zeitschr. 180, 105, 1927.



nicht zu Ende geführt ist. Es wurde nun die Reaktionstemperatur und die Alkalität der Lösung konstant gehalten und die Reaktionszeit systematisch gesteigert. Es ergab sich, daß unter denselben Bedingungen, unter denen die Glucoseoxydation in 15 Minuten quantitativ abläuft, die Brenztraubensäurereaktion 30 Minuten benötigt. Diese Tatsache läßt sich damit erklären, daß die Brenztraubensäure, welche im Verlauf der Glucoseoxydation in statu nascendi entsteht, viel reaktionsfähiger ist als gewöhnliche Brenztraubensäure, welche vermutlich viel stabiler und eventuell in einer polymeren Form vorliegt. In allen vorliegenden Versuchen wurde daher eine Reaktionszeit von 35 Minuten eingehalten.

Angewandt: 2,50 ccm 0,100 n NaOH,
2,00 „ 0,1276 n Chloramin,
2,00 „ H_2O (im Blindwertversuch)
bzw. 2,00 „ 0,0288 mol. Brenztraubensäurelösung (im Hauptversuch),
35 Minuten Reaktionszeit auf dem siedenden Wasserbad.

Nach der Reaktion ansäuern mit etwa 2 ccm 30proz. Essigsäure, dazu 1 ccm etwa 1 n KJ, Titration mit 0,100 n Thiosulfat.

[Die Brenztraubensäurelösung wurde in der Weise hergestellt, daß 2,00 ccm Brenztraubensäure (spezifisches Gewicht 1,267, Mol.-Gew. 88,03) mit Wasser zu 1 Liter gelöst werden.]

Verbraucht: 1. im Blindwertversuch

(2,43)
2,42
2,44
2,41
2,43
2,40
} Mittel: 2,420 ccm 0,1 n Thiosulfat

2. im Hauptversuch

(1,32)
1,29
1,29
—
1,28
1,28
} Mittel: 1,285 ccm 0,1 n Thiosulfat

Die Berücksichtigung des Blindwertes erfolgt in folgender Weise:

In die Reaktion eingeführt 2,00 ccm 0,1276 n Chloramin	= 0,2552 Milli-Äquivalente
Im Blindwertversuch gefunden 2,00 ccm 0,2420 n Chloramin	= 0,2420 „
Differenz wurde durch das Kochen mit Alkali zerstört	= 0,0132 Milli-Äquivalente

Hierbei war das gesamte Chloramin während der ganzen Reaktionszeit der zerstörenden Wirkung des Alkalis ausgesetzt. Dies ist beim Hauptversuch nicht der Fall, weil ein großer Teil des Chloramins von

der Brenztraubensäure verbraucht wird. Also darf auch nicht der ganze Blindwert (0,0132 Milli-Äquivalente), wie er im Blindwertversuch gefunden wurde, im Hauptversuch in Rechnung gesetzt werden, sondern nur ein Teil davon. Im Blindwertversuch waren während der ganzen Reaktionszeit der zerstörenden Wirkung des Alkalis 0,2420 Milli-Äquivalente ausgesetzt, im Hauptversuch hingegen nur 0,1285 Milli-Äquivalente. Der experimentell gefundene Blindwert 0,0132 ist also im Verhältnis $\frac{1285}{2420}$ zu teilen = 0,0070 Milli-Äquivalente. Der auf diese Weise errechnete Blindwert ist etwas zu klein. Da die Reaktion zwischen Chloramin und Brenztraubensäure nicht momentan verläuft, ist mehr Chloramin der zerstörenden Wirkung des Alkalis ausgesetzt, als beim Hauptversuch als Restchloramin gefunden wird. Statt 0,0070 wird also 0,010 (Mittel zwischen 0,07 und 0,013) als Blindwert eingesetzt. Statt des Titerwertes des Chloramins 0,2552 Milli-Äquivalente wird also der reduzierte Titerwert 0,2552 bis 0,0100 = 0,2452 Milli-Äquivalente angenommen.

Es ist klar, daß unter diesen Umständen keine größere Genauigkeit als etwa 1 Proz. erreicht werden kann.

I. Auswertung des Versuchs.

In die Reaktion eingeführt	= 0,2452 Milli-Äquivalente
Nach der Reaktion gefunden . . .	= 0,1285 ,,
Differenz von der Brenztraubensäure verbraucht	= 0,1167 Milli-Äquivalente Chloramin
In die Reaktion eingeführt 2,00 ccm 0,0288 mol. Brenztraubensäure .	= 0,0576 Millimol Brenztraubensäure

Also wurden verbraucht 2,026 Milli-Äquivalente Chloramin pro Millimol Brenztraubensäure.

Dieser Versuch beweist mit einer Genauigkeit von etwa 1 Proz., daß *1 Mol Brenztraubensäure 2 Äquivalente Sauerstoff verbraucht.*

II. Messung der entstandenen Kohlensäure.

Angewandt: 2,50 ccm 0,100 n NaOH,
2,00 ,, 0,1276 n Chloramin,
2,00 ,, 0,0288 mol. Brenztraubensäurelösung,
35 Minuten Reaktionszeit auf dem siedenden Wasserbad.

Nach der Reaktion wird der Lösung etwa 1 g festes NaCl und etwa 20 ccm gesättigte $BaCl_2$-Lösung zugesetzt und weitere 10 Minuten gekocht. Dann wird zentrifugiert und die klare Lösung von dem gefällten $BaCO_3$ dekantiert. Durch mehrmaliges Auffüllen mit Wasser, Zentrifugieren und Dekantieren wird das $BaCO_3$ völlig rein erhalten.

Das $BaCO_3$ wird dann mit 3,00 ccm 0,100 n H_2SO_4 übertitriert, durch Digerieren und Erwärmen vollständig zur Lösung gebracht und mit 0,100 n NaOH zurücktitriert (Phenolphthalein als Indikator).

Verbraucht: 1,87, 1,88, 1,86, 1,87, 1,86 } Mittel: 1,868 ccm 0,100 n NaOH

In der Reaktion gefunden 0,3000 bis 0,1868	= 0,1132 Milli-Äquiv. Kohlensäure
In die Reaktion eingeführt	= 0,0576 Milli-Äquiv. Brenztraubensäure

Das sind 1,97 Milli-Äquivalente Kohlensäure pro Millimol Brenztraubensäure.

Damit ist mit einer Genauigkeit von etwa 1,5 Proz. erwiesen, daß aus *1 Mol Brenztraubensäure 2 Äquivalente* (= *1 Mol*) *Kohlensäure entstehen.*

III. Messung der entstandenen Essigsäure.

Angewandt: 2,50 ccm 0,100 n NaOH,
2,00 „ 0,1276 n Chloramin,
2,00 „ 0,0288 mol. Brenztraubensäure,
35 Minuten Kochen auf dem siedenden Wasserbad.

Nach der Reaktion wird die Lösung mit 3,00 ccm 0,100 n H_2SO_4 übertitriert, weitere 10 Minuten gekocht und mit 0,100 n NaOH zurücktitriert (Phenolphthalein als Indikator).

Verbraucht: 1,00, 1,06, 1,06, 1,06, 1,09 } Mittel: 1,074 ccm 0,100 n NaOH

In die Reaktion eingeführt 2,50 ccm 0,100 n NaOH	= 6,2500 Milli-Äquivalente Alkali
Nach der Reaktion gefunden 0,3000 bis 0,1074	= 0,1926 „ „
Differenz von der entstandenen Essigsäure neutralisiert	= 0,0574 Milli-Äquivalente Alkali
In die Reaktion eingeführt	= 0,0576 Millimol Brenztraubensäure

Damit ist mit großer Genauigkeit erwiesen, daß *1 Mol Brenztraubensäure 1 Mol Essigsäure liefert.*

Zusammenfassung.

Durch die angeführten Versuche konnte gezeigt werden, daß Brenztraubensäure in alkalischer Lösung durch Chloramin quantitativ zu Essigsäure und Kohlensäure oxydiert wird und dabei 2 Äquivalente Sauerstoff verbraucht. Die Annahme, daß die Oxydation der Glucose

mittels Chloramin, welche ebenfalls zu Essigsäure und Kohlensäure führt, über die Zwischenstufe der Brenztraubensäure verläuft, wird dadurch wesentlich gestützt.

Wir möchten nicht verfehlen, auf die Zusammenhänge unserer Feststellungen (I. und II. Mitteilung dieser Serie) mit den bekannten und grundlegenden Arbeiten *C. Neubergs* über die Gärungsabläufe hinzuweisen. Die Oxydation der Glucose führt unter den geschilderten Zuständen zu den gleichen Schlüsselsubstanzen des Hexosenabbaues, wie sie bei der weinigen und anderen Gärungen entstehen bzw. sehr wahrscheinlich sind. Wir werden bei der Fortsetzung unserer Arbeiten auf diese Beziehungen noch besonders eingehen.

Studien über Gewebsatmung.

III. Mitteilung[1]):

Der Einfluß des physikalisch-chemischen Milieus auf die Atmung überlebender Warmblüterorgane.

Von

H. Reinwein und W. Singer.

(Aus der medizinischen Poliklinik zu Rostock.)

(Eingegangen am 21. Januar 1927.)

Nachdem bei Untersuchungen über die Aufnahme von Sauerstoff durch das überlebende Warmblüterprotoplasma sich eine im Vergleich zum lebenden Tiere auffallende Gleichmäßigkeit ergeben hatte (1), galt es der Frage näher zu treten: „Welches sind die besonderen Einrichtungen, mittels derer der überlebende Organismus seine Eigengewebsatmung dem Energiebedarf des Gesamtorganismus anpassen kann?" Wie schon in der früheren Mitteilung bemerkt wurde, könnte man daran denken, daß die Verbrennungsgröße eine Variable der Durchblutungsgröße und damit auch der Summe der vorhandenen Blutgefäße sein könnte. Leider liegen bisher zu wenig Untersuchungen über die Anzahl der Blutgefäße, besonders der Kapillarenanzahl pro Gewebseinheit der einzelnen Tierklassen vor. Es erscheint aber doch das eine daraus hervorzugehen, daß die Summe der Kapillaren mit zunehmender Größe des Tieres etwas abnimmt. Man kann also von diesem Gesichtpunkte aus eine Determinante finden, die dahin wirken könnte, daß die Atmungsgröße der Zellen von demselben Organ verschiedener Tiere auffallend gleich ist, sie reicht aber noch nicht aus, es müssen noch andere Vorrichtungen vorhanden sein, die nach Entnahme aus dem Zellkomplex, dem Organ bzw. dem Gesamtorganismus entfallen.

---

[1]) Die wichtigsten Tatsachen dieser Arbeit wurden bereits auf der zweiten Tagung der nordwestd. Vereinigung für innere Medizin, Januar 1925, mitgeteilt. Vgl. weiter *E. Grafe*, Deutsch. med. Wochenschr. 1925, Nr. 16.



I. Wirkung von Änderungen der Isotonie.

Wir wissen aus den bekannten Untersuchungen von *Jean Jaques Loeb*, *Ringer*, *Warburg* u. a., wie weitgehend jede Lebensäußerung von der Zusammensetzung der Umspülungsflüssigkeit beeinflußt werden kann. Die erste Teilfrage war also, wie verhält sich die Atmung, wenn die osmotische Kraft der Nährflüssigkeit bei gleichbleibender prozentualer Zusammensetzung geändert wird, oder, mit anderen Worten, ergibt sich ein Unterschied in dem Sauerstoffverbrauch der Zellen desselben Organs, wenn man einige in einer Ringerlösung atmen läßt, deren osmotische Kraft, gemessen in der Gefrierpunktserniedrigung gleich der des Blutes des betreffenden Tieres ist, während andere in einer Ringerflüssigkeit suspendiert sind, die zum Blute hypo- oder hypertonisch ist?

Tabelle I zeigt einige diesbezügliche Untersuchungen. Betreffs der Methode sei erwähnt, daß wir uns in allen diesen Untersuchungen einer Ringerlösung bedienten, die nach den Angaben von *Warburg* (2) zusammengesetzt war. Den Verbrauch an Sauerstoff bestimmten wir in diesem Falle nach der in dieser Publikation angegebenen Methode. Es wurden nur solche Kontrollbestimmungen verwandt, bei denen die Doppelbestimmungen nicht über 10 Proz. differierten.

Tabelle I.

Einfluß der osmotischen Kraft.

Sauerstoffaufnahme pro Gramm Gewebe suspendiert in Ringerlösung von wechselnder Konzentration in 1 Minute bei 37°.

Versuche an Kaninchenleber.

Sauerstoffaufnahme		Sauerstoffaufnahme	
	Δ 0,56		Δ 0,14
bei	0,132	bei	0,092
	0,128		0,08
	Δ 0,56		Δ 0,27
Meerschweinchen bei	0,092	bei	0,067
	0,098		0,073
	Δ 0,56		Δ 0,35
bei	0,148	bei	0,150
	0,146		0,145
	Δ 0,56		Δ 0,75
bei	0,141	bei	0,117
	0,137		0,115
	Δ 0,56		Δ 0,102
bei	0,163	bei	0,09, 0,089
	0,168, 0,165		0,099, 0,103

Sauerstoffaufnahme pro Gramm Gewebe suspendiert in Ringerlösung bei wechselnder Konzentration.

Versuche an Meerschweinchenniere.

Sauerstoffaufnahme		Sauerstoffaufnahme	
bei	Δ 0,56 0,36, 0,358 0,38, 0,36	bei	Δ 0,14 0,173, 0,175 0,23, 0,24
bei	Δ 0,56 0,38, 0,35	bei	Δ 0,27 0,37, 0,35
bei	Δ 0,56 0,371 0,35	bei	Δ 0,35 0,372 0,34
bei	Δ 0,56 0,317, 0,314	bei	Δ 0,75 0,189, 0,181
bei	Δ 0,56 0,352, 0,348 0,40, 0,38	bei	Δ 1,02 0,172, 0,158 0,25, 0,23

Aus diesen Versuchen geht hervor, daß es uns durch kleine Änderungen des Δ niemals, weder bei der Leber noch bei der Niere, gelang, den Sauerstoffverbrauch außerhalb der Fehlergrenze (= 10 Proz.) zu steigern, die Vitalität wird aber gestört, sobald die Differenz des Δ nach oben oder nach unten gegenüber dem normalen osmotischen Druck groß wird. Nach unseren Versuchen liegt das günstigste Milieu zwischen Δ 0,35 bis Δ 0,75. Auffallend erschien es uns, daß die Nierenzellen relativ leicht alteriert werden, obgleich doch ihr Sekretionsprodukt, der Harn, bei normalen Menschen weitgehende Schwankung betreffs des osmotischen Druckes zeigt.

Unger (3) fand bei Untersuchungen über den Einfluß hypo- und hypertonischer Lösungen auf die Sauerstoffaufnahme des isolierten Froschrückenmarks, daß hypotonische Kochsalzlösungen bis herunter zum destillierten Wasser keinen Einfluß auf die Oxydationsgröße des von der Pia noch umhüllten Rückenmarks ausüben, wenn auch dadurch die Reflexerregbarkeit früher oder später in meist irreversibler Form aufgehoben wurde. Hypertonische Kochsalzlösungen dagegen verursachen nach ihm ein Steigen des Sauerstoffverbrauchs mit einer anfänglichen Steigerung aber bald nachfolgender Aufhebung der Reflexerregbarkeit. *Battelli* und *Stern* (4) zeigten schon 1907, daß hypertonische Kochsalzlösung auf die Atmung fein verteilter Muskulatur von Mammalia hemmend wirkt. Zu demselben Ergebnis kam *Thunberg* (5) bei Versuchen mit Froschmuskulatur, wobei er sich gasanalytischer Methoden bediente. In dieser Arbeit weist *Thunberg* auch darauf hin, wie schwierig es ist, dieses Problem experimentell einwandfrei anzugreifen. Es ist ja nicht möglich, den osmotischen Druck zu variieren, ohne auch die chemischen Faktoren der Umspülungsflüssigkeit zu ändern, auch die p_H-Konzentration wird, wenn auch nur wenig, so doch sicher verändert. Wie aus früheren Untersuchungen von *Warburg*, *Büchner* und *Grafe* (6) und eigenen, über die im folgenden berichtet wird, hervorgeht,

ist der Einfluß der H-Ionenänderung wohl praktisch zu vernachlässigen. *Ahlgren* (7) kommt nach seinen Versuchen zu dem Ergebnis, daß man aus der Konstanz des Reduktionsvermögens gegenüber Methylenblau sowohl in Phosphat- wie Kochsalzversuchen mit ziemlich großer Sicherheit den Schluß ziehen kann, daß die Oxydationsintensität in den Geweben für Variationen des osmotischen Druckes innerhalb eines Gebiets, das sich von der Isotonie bis zu relativ niedrigen Werten heraberstreckt, unempfindlich ist. *Meyerhof* (8) gibt an, daß bei der Wirkung des Phosphats auf die Gewebsatmung auch der osmotische Druck auf die Weise maßgebend ist, daß die Atmung sowohl bei Erhöhung als auch bei Verringerung der Konzentration um 1,5 Proz. herabgesetzt wird.

Wir haben nur die Leber- und Nierenzellen untersucht, glauben aber kaum, daß die übrigen Drüsen sich anders verhalten. Ließen wir die Zellverbände länger als eine Stunde in dem geänderten Milieu, so sank der Sauerstoffverbrauch, berechnet auf eine Zeiteinheit, immer mehr, der Sauerstoffverbrauch stieg auch nicht wesentlich wieder an, wenn man die betreffenden Organschnitte wieder in eine Nährflüssigkeit legte, deren Δ dem des Blutes entsprach. Man kann das Ergebnis dieser Versuche wohl dahin zusammenfassen: Änderung des Milieus betreffs osmotischer Konzentration, gemessen in der Gefrierpunktserniedrigung, bewirkt höchstens eine Schädigung der Zellen, wenigstens was die Sauerstoffaufnahme betrifft, es handelt sich allem Anschein nach dabei nicht um einen reversiblen Prozeß. Geringere Änderung des osmotischen Druckes, d. h. Δ 0,35 bis Δ 0,75, die allerdings im lebenden Organismus, soweit wir wissen, nicht mehr vorkommen (abgesehen von der Niere), sind ohne nachweisbare Einwirkung auf die Sauerstoffzehrung. Es erscheint dies von besonders praktischem Werte, weil man bei Versuchen am überlebenden Gewebe nicht besondere Maßnahmen zu ergreifen braucht, um den osmotischen Druck ängstlich konstant zu halten. Zu demselben Schluß kommt *Ahlgren* (l. c.).

II. Wirkung der Änderungen der H-Ionenkonzentration.

Seit den Untersuchungen von *Winterstein* über die Erregbarkeit des Atemzentrums und den zahlreichen Arbeiten über den Einfluß der H-Ionenkonzentrationen auf alle möglichen vitalen Vorgänge und der Ausbildung einer guten Untersuchungstechnik, sind wir gewohnt, mit einer Abhängigkeit biologischer, ja rein chemischer Prozesse von dem p_H der Umgebung zu rechnen. Untersuchungen über den Einfluß der Acidität bzw. Alkalität auf die Oxydationen in den Geweben wurden schon von *Battelli* und *Stern* (9) angestellt, bevor es möglich war, die aktuelle Reaktion genau zu messen. Sie fanden, daß die Hauptatmung durch eine geringe Alkalität des Milieus verbessert, durch eine stärkere OH-Ionenkonzentration aber gänzlich vernichtet wird. Refraktär soll sich im Gegensatz hierzu bei den erwähnten Änderungen die akzessorische Atmung verhalten. Überwiegen der H-Ionen schädigte beide Arten der Atmung. *Thunberg* (10) fand in seinen mikrorespirometrischen Versuchen über den Einfluß des p_H,

daß sowohl OH- wie H-Ionen hemmend wirken. *Warburg* (11) wies nach, daß die Sauerstoffaufnahme bei Strongylocentrotuseiern bei Zunahme der OH-Ionen wächst. *Loeb* und *Wasteney* (12), *Clendon* und *Mitchell* (13) kamen zu demselben Ergebnis bei Arbacia bzw. Seeigeleiern. *Meyerhof* erwähnt in seinen Arbeiten über die Atmung der Froschmuskulatur, daß das Atmungsoptimum am Neutralpunkt oder ganz wenig nach der alkalischen Seite verschoben liege. Zu demselben Ergebnis kommt *Thunberg* 1920 (14). *Warburg* (l. c.) hatte die Wirkung der OH-Ionen auf die Oxydationsgeschwindigkeit der Strongylocentrotuseiern hauptsächlich als Folge einer physikalischen oder chemischen Zustandsänderung der umgebenden Plasmahaut angesehen. *Ellinger* und *Landsberger* (15) weisen mit Recht darauf hin, daß außer dieser *Warburg*schen Erklärung noch weitere Möglichkeiten in Betracht zu ziehen sind, einmal könnten die Aminosäuren in der COOH-Gruppe stärker dissoziiert sein und leichter verbrannt werden, andererseits könnte auch eine lokale Anhäufung der OH-Ionen in der Zelle selbst bedeutsam werden. Der Angriffspunkt wäre, in der *Warburg*schen Terminologie über die Atmung am Kohlenmodell gesprochen, an den Brennorten oder am Brennmaterial zu suchen. Bei den Brennorten wäre zwischen einer Wirkung auf Katalyse oder Adsorptionsänderung zu unterscheiden. Sie stellten diesbezügliche Versuche mit gewaschenen Gänseerythrocyten an und kamen zu dem Ergebnis, daß die eigentliche Zellreaktion durch die primäre starke Pufferung der Zellen fast nicht beeinflußt wird. Quellungs- und Adsorptionsfähigkeit bleiben unverändert, es zeigte sich auch kein Einfluß auf die Eisenkatalyse. Sie sehen daher den Angriffspunkt für die H-Ionenkonzentration lediglich im Brennmaterial durch eine Änderung der Dissoziation in der COOH- bzw. in der NH_2-Gruppe. Es ergab sich betreffs des Sauerstoffverbrauchs eine fast lineare Abnahme mit wachsender H-Ionenkonzentration. Schon in seinen ersten Arbeiten über die Carcinomzelle wies *Warburg* darauf hin, daß bei Schwankung des p_H zwischen 6,5 und 8,5 keine wesentliche Beeinflussung der Leber- oder Carcinomzellenatmung erkennbar wird.

Es erscheint nicht von vornherein erlaubt, Erfahrungen am Seeigelei oder intakten roten Blutkörperchen auf Versuche an den Warmblüterzellverbänden zu übertragen. Bei Untersuchungen der Gewebsschnitte handelt es sich ja um Zellen, die aus einer Gesamtheit herausgelöst sind, während man das Ei als solches wohl doch noch als Gesamtorganismus bezeichnen kann. *Büchner* und *Grafe* kamen, wie schon erwähnt, zu demselben Ergebnis. Wenn wir nochmals diesbezügliche Untersuchungen anstellten, so geschah es, um festzustellen, ob nicht außerhalb der von *Warburg*, *Grafe* und *Büchner* gezogenen Grenzen, die zwar an sich schon weit außerhalb der im lebenden Organismus allseits angenommenen H-Ionenschwankungen liegen, eine Änderung eintreten kann.

Auch hier bedienten wir uns der alten *Warburg*schen Methode, eine Variation des p_H bei sonst gleichbleibender osmotischer und prozentualer Verteilung der in der Umspülungsflüssigkeit vorhandenen Elemente, erreichten wir durch Anwendung der von *Rhode* und *Saito* (16) empfohlenen Durchspülungsflüssigkeit. Vor und nach jedem Versuch prüften wir mit Hilfe der *Michaelis*schen Indikatorenmethode die Reaktion und konnten

uns einerseits von der Richtigkeit der von obengenannten Autoren angegebenen p_H überzeugen, andererseits auch ersehen, daß die Reaktion nach ein- oder zweistündigen Versuchen in der Flüssigkeit annähernd dieselbe geblieben war. Nichts können wir darüber aussagen, ob nun tatsächlich auch im Inneren der Gewebsschnitte eine wesentliche Änderung des p_H eintrat. Schon vor Anstellung der eigentlichen Atmungsmessung versuchten wir durch Liegenlassen der Gewebsschnitte in der betreffenden Flüssigkeit, die mit Sauerstoff durchperlt und häufig gewechselt wurde, das Pufferungsvermögen des Zellinhalts abzuschwächen, eine gänzliche Erschöpfung ist selbstverständlich nicht möglich, da man dann ja auch nicht mehr von überlebenden Zellen reden kann.

Tabelle II.

Meerschweinchenniere.

Sauerstoffverbrauch, berechnet für 1 g Gewebe in 1 Minute bei 37° Temperatur.

4,5	5,6	6,5	7,4	7,6	8,0	8,4	8,6	9,6	
0,180 0,20 0,22			0,3108 0,3057 0,290			0,3099 0,312			
0,1762 0,176	0,1975 0,200	0,314 0,305	0,332 0,31						
			0,40 0,37	0,395 0,365	0,420 0,426	0,431 0,440	0,367 0,360		Kaninchenniere
			0,3845 0,375	0,40 0,356	0,42 0,43	0,41 0,42			
			0,374 0,365					0,267 0,272 0,270	

Meerschweinchenleber.

Sauerstoffverbrauch, berechnet für 1 g Gewebe in 1 Minute bei 37° Temperatur.

4,5	5,6	6,5	7,4	7,6	8,0	8,4	8,6	9,6
0,048 0,046			0,0976 0,0977			0,1153 0,130		
0,062 0,0686		0,0868 0,093	0,108 0,113			0,130 0,125		
0,051 0,050	0,073 0,071	0,074 0,072	0,088 0,092		0,096 0,098			
			0,087 0,085	0,094 0,093		0,104 0,111	0,066 0,062	
			0,087 0,031 0,089	0,110 0,120		0,111 0,114	0,063 0,068	
0,041 0,046			0,089 0,088		0,095 0,093			0,060 0,062

Tabelle II zeigt den Einfluß des p_H auf die Sauerstoffzehrung, wir möchten an dieser Stelle darauf hinweisen, daß wir, auch wenn keine Änderung des Sauerstoffverbrauchs eingetreten ist, nicht ohne weiteres annehmen, daß intermediäre Vorgänge dann auch nicht beeinflußt sind.

Aus der Tabelle ist zu ersehen, daß die isolierten Zellen auffallend zähe, unbeeinflußt von der Reaktion des umspülenden Milieus die Atmungsgröße beibehalten. Ob es sich hierbei lediglich um das Vermögen der guten Pufferung handelt, kann man vorerst nicht definitiv sagen. Eine Verschiebung auf die alkalische Seite läßt ein geringes Ansteigen der Sauerstoffzehrung erkennen, es sei hier betont, daß wir nur solche Versuche verwerteten, bei denen die *Warburg*sche Grundforderung erfüllt war: Gleichmäßiger Sauerstoffverbrauch innerhalb der jeweiligen Ablesungszeiten. Innerhalb einer Stunde war dies bei allen angeführten Untersuchungen erfüllt, verlängerte man die Untersuchungsdauer, so fingen die Zellen in den extremsten Versuchsbedingungen an, unregelmäßig Sauerstoff aufzunehmen. Hin und wieder machten wir bei anderen Versuchen die Beobachtung, daß manchmal, wenn die Umspülungsflüssigkeit extrem alkalisch wurde (z. B. durch Überkippen der Kalilauge in das größere Reservoir), nach der üblichen Wartezeit, die eine gleichmäßige Diffusion und Erwärmung bewirken soll, in den ersten Minuten ein auffallender Sauerstoffverbrauch stattfand, in den nächsten Minuten wurde die Atmung immer geringer und hörte meistens nach kurzer Zeit ganz auf. Vielleicht geht also dem Absterbeprozeß ein gesteigerter Sauerstoffverbrauch voraus oder mit ihm einher, wir möchten aber nicht aus einigen Beobachtungen, zu deren genauen Analyse man sich anderer Versuchstechnik bedienen müßte, weitgehende Schlüsse ziehen. Wir entnehmen unseren Untersuchungen, daß eine Änderung der umgebenden Reaktion bei isolierten Gewebszellen nur geringen Einfluß hat. Innerhalb der physiologischen Grenzen ist die Sauerstoffzehrung praktisch die gleiche. Das Optimum liegt etwas nach der alkalischen Seite bei etwa p_H 8,0 bis 8,4. Wie *Ahlgren* in seiner nach Abschluß unserer Versuche erschienenen zusammenfassenden Arbeit angibt, haben *Essen* und *Möller* neuerdings die Einwirkung der H-Ionen auf das Reduktionsvermögen der Muskulatur von Fröschen und Meerschweinchen mit der Methylenblaumethode studiert. Sie fanden, daß das Reduktionsvermögen von 6,5 mit zunehmender Alkaleszenz langsam steigt, bis etwa bei 8,3 ein Optimum erreicht ist. Diese Ergebnisse bestätigen demnach unsere Resultate. Zu ganz anderen Ergebnissen kam *Ryffel* (17), der den Einfluß des p_H des Milieus bei überlebendem Muskelgewebe mittels der Dinitromethode von *Lipschitz* untersuchte. Er fand das Optimum für die Sauerstoffzehrung der Frosch-, Meerschweinchen- und Tauben-

muskulatur bei p_H 9 bis 10 gelegen. Das gleiche p_H-Optimum für die Atmung der Fischmuskulatur fanden *Hess* und *Ryffel* (18).

III. Die Wirkung von Elektrolyten auf die Gewebsatmung.

Es galt nun weiter, der Frage der Wirkung der Salze auf die Oxydationsgröße der überlebenden Gewebsschnitte näherzutreten.

Es handelt sich dabei von vornherein um eine Wirkung von Ionen und Molekülen. Vor allem durch die Elektrolyttheorie von *Kraus-Zondek* (19) und ihren Mitarbeitern ist die Wichtigkeit der richtigen Verteilungsverhältnisse der Calcium-, Kalium- und Natriumionen für den ungestörten Verlauf der Gewebsfunktionen dargetan worden. *Zondek* spricht ja direkt von einer Identität von Nerven- und Ionenwirkung. *Arnoldi* (20) bemühte sich, zu zeigen, daß es möglich ist, den Sauerstoffverbrauch des isolierten Herzens in gesetzmäßiger Weise durch Änderung der Ringerflüssigkeit zu beeinflussen, so daß man sogar von einem biologischen Antagonismus zwischen Wasser und Kochsalz, Kalium und Calcium, Bicarbonat und Phosphat reden kann. *Unger* (l. c.) konnte unter *Wintersteins* Leitung bei seinen Untersuchungen am isolierten Froschrückenmark irgend einen Antagonismus zwischen Natrium-, Kalium-, Calciumionen hinsichtlich des Sauerstoffverbrauchs nicht finden. Kaliumsalze zeigten in iso- und hypotonischen Lösungen keine Beeinflussung, in hypertonischen Lösungen trat eine Änderung des Sauerstoffverbrauchs ein. Calciumsalze wirken nach ihm in jeder Konzentration verschlechternd auf den Sauerstoffverbrauch. *Unger* nimmt als geeignetste Umspülungsflüssigkeit die isotone Kochsalzlösung. *Thunberg* (21) wies schon 1909 in seinen Mikrorespirationsversuchen die deletäre Wirkung des Calciums nach. *Warburg* (22) zeigte die Giftigkeit der Calciumionen in Versuchen mit lädierten Gänseerythrocyten, *Meyerhof* (l. c.) am Froschmuskelbrei, *Klockmann* und *Moro* (23) an Darmzellen. *Lange* (24) untersuchte den Einfluß des Calciums sowohl auf den Glykogen-, Lactacidogen-, Milchsäurestoffwechsel wie auch auf den Gasaustausch. Bei der Atmung fand er eine diphasische Wirkung. In Konzentrationen von molar bis m/125 erhielt er eine Hemmung, bei m/625, dagegen eine Steigerung über 15 Proz. gegenüber dem Wasserwert. *Lange* bringt die Calciumwirkung in Zusammenhang mit kolloidchemischen Veränderungen. Gerade diese *Lange*schen Versuche zeigen, daß die Ionen an den überlebenden Zellverbänden ganz verschiedene Angriffspunkte haben können. Das, was *Weizsäcker* (25) bei seinen Untersuchungen am Herzen fand, nämlich, daß bei regelmäßiger guter Herztätigkeit die Sauerstoffaufnahme nicht sehr groß zu sein braucht, bei schlechter Tätigkeit dagegen sich oft ein Mehrverbrauch an Sauerstoff zeigt, dürfte bis zu einem gewissen Grade auch an den überlebenden Zellverbänden nachweisbar sein. *Thunberg* (26) hatte gezeigt, daß das Reduktionsvermögen, das mit destilliertem Wasser extrahierte Froschmuskulatur gegenüber Methylenblau hat, durch Zusatz von Natriumchlorid und Kaliumchlorid verstärkt werden kann. Eine noch stärkere Wirkung zeigte Zusatz von Phosphat. *Ahlgren* (l. c.) findet, daß hypertonische Kochsalzlösungen immer mehr oder minder hemmend wirken, Kaliumchlorid zeigte auf die Oxydationsintensität von ungewaschenem Froschmuskelbrei keine beschleunigende Wirkung. *Ellinger* (27) kommt bei Untersuchungen mit ausgewaschenen Gänseerythrocyten, die obendrein durch Gefrieren gesprengt wurden, zu dem Ergebnis, daß das Vorhandensein von Kalium in der Nährlösung unbedingtes Erfordernis ist. Durch Herab-

setzung der Kaliumkonzentration wird der Oxydationsprozeß erheblich verschlechtert. Durch Vermehrung des Kaliums wird er zunächst verbessert, nimmt aber bei stärkerer Vermehrung wieder ab. Das Kalium kann durch Rubidium ersetzt werden, ein Ersatz durch Cäsium ist nicht möglich. Unentschieden bleibt nach seinen Versuchen, ob das Kalium als Ion wirkt oder infolge seiner radioaktiven Eigenschaft.

Auch wir fanden, daß destilliertes Wasser auf die Sauerstoffzehrung deletär wirkte, es kombinieren sich ja in diesem Falle osmotische Einflüsse und der Mangel an Elementen. Fast immer schon nach einer halben Stunde, die wir wegen Temperaturausgleich abwarteten, war der Sauerstoffverbrauch praktisch erloschen. Wie aus Tabelle III ersichtlich, findet aber auch in physiologischer Kochsalzlösung ein geringerer Verbrauch statt, wie bei den Zellen, die in der von *Warburg* angegebenen Flüssigkeit suspendiert waren. Um die Wirkung der Calcium- und Kaliumionen zu verfolgen, kann man auf drei verschiedene Weisen vorgehen. Man kann das Verhältnis beider Ionen zueinander ändern oder eines der Elemente aus der Ringerflüssigkeit weglassen oder drittens zu einer Kochsalzlösung Kalium oder Calcium zufügen.

Tabelle III.

Verhalten der Sauerstoffzehrung von Nierengewebsschnitten in gewöhnlichem Ringer, physiologischer Kochsalzlösung, Kochsalz und Natronbicarbonat, in Ringerlösung, der das Calcium fehlt.

Gewöhnl. Ringer	Kochsalz und Natronbicarbonat	Ringer ohne Calciumchlorid	Physiologische Kochsalzlösung
0,349, 0,356	0,301, 0,285	0,31, 0,29	0,175, 0,190
0,305, 0,309	— —	0,241, 0,285	— —
		0,249, 0,267	

Tabelle IV.

Verhalten der Sauerstoffzehrung von Nierengewebsschnitten in gewöhnlichem Ringer, physiologischer Kochsalzlösung, Kochsalz- und Natronbicarbonat, in Ringerlösung, der das Kalium fehlt.

Gewöhnl. Ringer	Kochsalz und Natronbicarbonat	Ringer ohne Kaliumchlorid	Physiologische Kochsalzlösung
0,35, 0,356	0,302	0,317, 0,32	0,167, 0,170
0,308, 0,309	0,278, 0,253	0,256, 0,322	— —

Tabelle V.

Der gewöhnlichen Ringerlösung wurden 0,2 ccm isotoner Kaliumchloridlösung zugesetzt, Versuch mit Kaninchenniere.

Kontrolle mit Ringer	Versuch
0,425, 0,41	0,407, 0,39



Tabelle VI.

Der gewöhnlichen Ringerlösung wurden 0,2 ccm isotoner Calciumchloridlösung zugesetzt, Versuch mit Kaninchenniere.

Kontrolle mit Ringer	Versuch
0,425, 0,41, 0,407	0,350, 0,336

Tabelle VII.

Verhalten in Kochsalz + 0,2 ccm isotoner Calciumchloridlösung; Kochsalz + Natriumbicarbonat + 0,2 ccm Calciumchlorid.

Ringerkontrolle	Kochsalzkontrolle	Kochsalz + Bicarbonat + Calciumchlorid	Kochsalz + Calciumchlorid
0,364, 0,356	0,100, 0,178	0,263, 0,258	0,240, 0,245

Tabelle VIII.

Verhalten in Kochsalz + 0,2 ccm isotoner Kaliumchloridlösung, Kochsalz + Natriumbicarbonat + 0,2 ccm Kaliumchloridlösung.

Ringerkontrolle	Kochsalzkontrolle	Kochsalz + Natriumbicarb. + Kaliumchlor.	Kochsalz + Kaliumchlorid
0,354, 0,346	0,190, 0,187	0,295, 0,297	0,263, 0,25

Diese Tabellen stellen einen Auszug unserer Versuchsergebnisse dar, wir betonen, daß alle verwertbaren Ergebnisse in diesem Sinne ausfielen. Wir können demnach nicht von einem direkten Antagonismus von Kalium und Calcium reden. Calciumchloridvermehrung scheint immer schädigend auf die Atmung zu wirken, diese Befunde decken sich mit denen früherer Untersucher. So eindeutige Befunde wie *Ellinger* betreffs der Kaliumchloridwirkung konnten wir nicht erhalten. Kalium einer gewöhnlichen gepufferten Natriumchloridlösung zugesetzt, steigert die Atmungsgröße wohl etwas, aber auch diese Differenzen liegen eigentlich in der Fehlergrenze. Bei Atmung in reiner isotoner Kaliumchlorid- oder Calciumchloridlösung, auch wenn diese durch Natriumbicarbonat gepuffert wurde, gehen die Zellen schnell irreversibel zugrunde. Auch hier scheint es sich um eine Schädigung der atmenden Struktur zu handeln, was wir daraus schließen möchten, daß die Atmung unregelmäßig wird und daß es nur in ganz wenigen Versuchen gelang, den Versuch eine Stunde lang fortzuführen. Unter Berücksichtigung der *Unger*schen Arbeit lenkten wir unsere Aufmerksamkeit besonders auf das Verhalten der Atmung in physiologischer Kochsalzlösung.

Tabelle IX.

Verhalten der Nierenzellenatmung von Meerschweinchen in physiologischer Kochsalzlösung.

Versuch mit Ringer	Versuch mit Kochsalzlösung
0,309, 0,308	0,167, 0,243
0,305, 0,309	0,175, 0,190
0,31, 0,304	0,138, 0,23
0,38, 0,39 (Kaninchen)	0,155, 0,14
Verhalten der Leberatmung	
0,109, 0,11	0,082, 0,081

Auch die Atmungsgröße in diesen Versuchen variiert sehr. Da wir uns vor Beginn der Arbeit in Reihenversuchen überzeugt hatten, daß es bei guter Übung gelingt, eine nur geringe Variation der Atmungsgröße zu erreichen, möchten wir auch diese Erscheinung als eine Schädigung der Zellverbände durch das nichtphysiologische Milieu auffassen. Wie schon aus den früheren Angaben in den Tabellen hervorgeht, könnte man daran denken, daß eine Zellschädigung schon allein durch die schlechte Pufferung gegen Kohlensäure, d. h. Fehlen des Natriumbicarbonats verursacht sein könnte. Aus dem Untersuchungsergebnis der folgenden Tabelle X könnte man auch tatsächlich entnehmen, daß Natronbicarbonat eine gewissermaßen entgiftende Wirkung hat.

Tabelle X.

Verhalten in physiologischer Kochsalzlösung + 0,2 ccm isotoner Natronbicarbonatlösung.

Versuch in Ringer		Versuch in Kochsalz + Natriumbicarbonat	
Nierenzellen			
0,364,	0,365	0,313,	0,308
0,402,	0,404	0,345,	0,331
0,413,	0,41	0,347,	0,345
0,360,	0,350	0,302,	0,295
Leber			
0,104,	0,11	0,099,	0,0998
0,113,	0,109	0,10,	0,101

Die Leber scheint überhaupt gegen Änderung der Elektrolyte weniger empfindlich als die Niere, es gilt dies auch betreffs des Sauerstoffverbrauchs bei Variation des Kaliums und Calciums. Wir brachten daher in den diesbezüglichen Tabellen auch nur unsere Ergebnisse bei den Nierenzellen; an den Leberzellen war die Einwirkung nicht außerhalb der Fehlergrenze der Methode zu bestimmen. Daß das Natronbicarbonat

keine Steigerung der Sauerstoffzehrung bewirkt, glauben wir durch folgende Versuchsanordnung erweisen zu können.

Wir bedienten uns auch hier der alten *Warburg*schen Atmungströgchen, nur hatten wir außer dem Rezipienten für die Lauge an der Außenseite des Gefäßes mittels eines Schliffes eine kleine Retorte anbringen lassen. Selbstverständlich darf hierdurch der Gesamtinhalt nicht sehr vergrößert werden, da sonst die Manometerausschläge in der Zeiteinheit zu klein werden. In die Retorte taten wir nun 0,1 bis 0,2 ccm Natriumbicarbonat, nach einer gewissen Zeit ließen wir diese zu der Ringerlösung, in der ein Gewebsschnitt lag, fließen, indem wir den Retortenbauch umdrehten, ohne dabei das Manometer aus dem Kasten emporzuheben. Niemals gelang es uns so, in der folgenden halben Stunde eine gegenüber der ersten größere Sauerstoffaufnahme zu erzielen. Bei gleichen Versuchen mit gewöhnlicher Kochsalzlösung blieb die Atmung regelmäßiger, wenn der Versuch nicht zu lange gedauert hatte, ein Mehrverbrauch an Sauerstoff fand aber auch nicht mehr statt. Die folgende Tabelle XI zeigt das Verhalten der Nierenzellen in einer Ringerlösung, der nur das Natriumbicarbonat fehlt, zum genauen Vergleich hatten wir auch einige Schnitte desselben Organs in physiologische Kochsalzlösung getan, wobei wiederum die sehr unter sich differierende Atmungsgröße in physiologischer Kochsalzlösung hervortritt.

Tabelle XI.

Verhalten von Nierenzellen in Ringer, dem Natronbicarbonat fehlt.

Kontrolle in gepuffertem Ringer		Physiologische Kochsalzlösung		Ungepufferter Ringer		
0,310,	0,304	0,24,	0,139	0,096,	0,10,	0,11
0,343,	0,349	—	—	0,192,	0,197,	
0,401,	0,398	—	—	0,220,	0,20	

Man möchte daraus ersehen, daß Calcium und Kalium, sobald Natriumbicarbonat fehlt, hemmend auf den Sauerstoffverbrauch wirken. Es gelang nicht, die Wirkung von Kalium und Calcium dabei einzeln einwandfrei zu analysieren, wie aus den früheren Tabellen zu ersehen ist.

Eine Steigerung der Atmung durch Kalium oder Calcium konnten wir auch in den Fällen nicht erhalten, wo wir uns der eben beschriebenen Methode bedienten, d. h. statt des Bicarbonats Kalium oder Calcium zufließen ließen. Das Verhalten der Sauerstoffzehrung in Normosallösung wich nicht von der der gewöhnlichen Ringerlösung ab. *Thunberg* hatte 1909 gemeint, daß das Kaliumphosphat notwendig ist, um einen normalen Gasaustausch zu erhalten. Wie *Ahlgren* in seiner Monographie mitteilt, soll sich nach unveröffentlichten Versuchen *Thunbergs* das Natriumphosphat genau so verhalten. *Thunberg* nimmt deshalb eine

Phosphatwirkung an. *Ahlgren* weist unseres Erachtens mit Recht darauf hin, daß vor allem die Pufferwirkung des Phosphats maßgebend sein könnte. In diesem Sinne würden auch unsere Versuche über das Verhalten in physiologischer, ungepufferter Kochsalzlösung und gepufferter Kochsalzlösung sprechen. Über die Phosphatwirkung als solche stellten wir keine besonderen Versuche an, nachdem wir gefunden hatten, daß die Sauerstoffzehrung in der Ringerflüssigkeit nach *Warburg* und in der *Rhode*schen Flüssigkeit praktisch gleich war. Wir lassen es vorläufig dahingestellt, ob den Phosphatlösungen als Suspensionsflüssigkeiten der Vorzug einzuräumen ist. Daß die Ringerlösung für fein verteilte Gewebe bei Atmungsversuchen direkt als ungeeignet bezeichnet werden dürfte (s. *Ahlgren*), können wir nicht bestätigen.

Selbstverständlich wäre es verfrüht, aus diesen Versuchen bindende Schlüsse gegen die Bedeutung der Elektrolytentheorie ziehen zu wollen, vor allem, da man ja gar nicht mit Sicherheit sagen kann, bei welcher Umspülungsflüssigkeit die Sauerstoffzehrung am optimalsten ist. Jeder Vergleich ist daher zurzeit noch willkürlich, es gilt vor allem zu untersuchen, ob sich nicht andere Ergebnisse bei Untersuchungen im arteigenen Serum zeigen. Auch möchten wir nochmals darauf hinweisen, daß man vorerst aus einer normalen Sauerstoffzehrung noch nicht ohne weiteres auf ungestörte intermediäre Vorgänge schließen kann, zumal sich unsere Untersuchungen meist nur über 1 Stunde, maximal 2 Stunden, erstreckten.

Literatur.

1) *Grafe, Reinwein, Singer*, diese Zeitschr. **165**, 102, 1925. — 2) *O. Warburg*, ebendaselbst **142**, 317, 1923. — 3) *Unger*, ebendaselbst **61**, 103, 1914. — 4) *Battelli* und *Stern*, Journ. de physiol. et de pathol. génér. **1**, 1, 1907. — 5) *Thunberg*, Skand. Arch. f. Physiol. **22**, 406, 1909. — 6) *Büchner* und *Grafe*, Deutsch. Arch. f. klin. Med. **144**, 1924. — 7) *Ahlgren*, Zur Kenntnis der tierischen Gewebsoxydationen, Lund. — 8) *Meyerhof*, Pflügers Arch. **175**, 20, 1919. — 9) *Battelli* und *Stern*, Monogr. — 10) *Thunberg*, Skand. Arch. f. Physiol. **23**, 154, 1909. — 11) *Warburg*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **66**, 305, 1910. — 12) *Loeb* und *Westeney*, diese Zeitschr. **37**, 410, 1911. — 13) *Clendon* und *Mitchell*, Journ. of biol. Chem. **10**, 459. — 14) *Thunberg*, Skand. Arch. f. Physiol. **40**, 1, 1920. — 15) *Ellinger* und *Landsberger*, Zeitschrift f. physiol. Chem. **128**, 264, 1924. — 16) *Rhode* und *Saito*, Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **38**. — 17) *Ryffel*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **129**, 223, 1923. — 18) *Hess* und *Ryffel*, Pflügers Arch. **200**, 124, 1923. — 19) *Kraus-Zondek*, Klin. Wochenschr. **3**, 707, 1924. — 20) *Arnoldi*, Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **43**, 465, 1924. — 21) *Thunberg*, Skand. Arch. f. Physiol. **22**, 406, 1909. — 22) *Warburg*, Beitr. z. Physiol. d. Zelle, Eregbn. d. Physiol. **14**. — 23) *Klockmann* und *Moro*, Jahrb. f. Kinderheilk. **79**, 676. — 24) *Lange*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **137**, 105, 1924. — 25) *v. Weizsäcker*, Pflügers Arch. **141**, 547; **147**, 135; **148**, 535. — 26) *Thunberg*, Skand. Arch. f. Physiol. **40**, 1920. — 27) *Ellinger*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **116**, 266, 1921.

B-Avitaminose und Nebenniere.

Von

Ernst Schmitz und **Maximilian Reiss** (Prag).

(Aus der Chemischen Abteilung des Physiologischen Instituts in Breslau.)

(Eingegangen am 22. Januar 1927.)

Unter den zahlreichen Einzelerscheinungen, die sich nach länger dauernder Entziehung von B-Vitamin bei Vögeln einstellen, stehen die nervösen Symptome dermaßen im Vordergrund, daß die ganze Erkrankung häufig mit dem Namen einer Polyneuritis, das Vitamin selber als Antineuritin bezeichnet wird. Die Darmerscheinungen und die Veränderungen in der chemischen Zusammensetzung fast aller Organe zeigen aber, daß damit nicht das Wesen, sondern nur eine Folge der Erkrankung erfaßt wird, und weisen der Forschung den Weg zu den Stoffwechselvorgängen.

Die Vitaminwirkung ist häufig mit der von Katalysatoren und Fermenten verglichen worden. Dieser Vergleich stimmt zu einigen ihrer Eigenschaften, wie der zunehmenden Labilität bei fortschreitender Reinigung, zu der hohen Hitzeempfindlichkeit. Aber auch bei der Darreichung von Vitaminpräparaten an avitaminöse Tiere hat man sehr häufig den Eindruck, daß ein bis dahin gehemmter Vorgang plötzlich wieder in Gang kommt. Schon kurze Zeit nach Aufnahme vergleichsweise sehr kleiner Mengen eines Vitaminpräparats sieht man Beriberitauben sich aufrichten, die Krämpfe verlieren sich und die Freßlust kehrt zurück, trotzdem natürlich die anatomisch und chemisch feststellbaren Läsionen noch nicht ausgeheilt sein können. Hier scheint buchstäblich eine katalytische Vitaminwirkung offenbar zu werden.

Dagegen bilden sich die genannten chemischen Veränderungen nur ebenso allmählich zurück, wie sie entstanden sind, und es dauert z. B. Wochen, bis das Gehirn seine frühere Masse wiedergewonnen hat. Auch bei diesen langsamen Änderungen sind die Vitamine beteiligt, aber zum mindesten hier muß ihre Wirkung eine indirekte, über Stoffwechselvorgänge hinweg erfolgende sein.

Daß der Abbau des Körper- und Nahrungsmaterials bei der B-Avitaminose verlangsamt ist, wissen wir aus den Messungen des

Gaswechsels durch *W. Hess*[1]) und *E. Abderhalden*[2]), nach denen sich der oxydative Stoffwechsel in der B-Avitaminose geradezu mit dem bei der Blausäurevergiftung vergleichen läßt. Da trotzdem die Verluste an Körpersubstanz ein ähnliches Ausmaß erreichen wie beim absoluten Hunger, muß der Stoffansatz ebenfalls schwer geschädigt sein. In erster Linie ist dafür natürlich die in den späteren Stadien der Erkrankung fast ganz aufhörende Nahrungsaufnahme verantwortlich gemacht worden; die absolut spezifischen Veränderungen in der Zusammensetzung der Organe, die bei Hungertieren vermißt werden, zeigen aber, daß auch ganz bestimmte Bahnen des intermediären Stoffwechsels gestört sein müssen.

Da wir wissen, daß das Nervensystem an der Steuerung der Stoffwechselvorgänge beteiligt ist, liegt es nahe, die auf beiden Gebieten statthabenden avitaminotischen Störungen miteinander in Verbindung zu bringen; wir sind aber noch nicht in der Lage, zu entscheiden, an welcher Stelle die Ursache, an welcher die Wirkung zu suchen ist. Dazu bedürfte es vergleichender Untersuchungen über die zeitliche Lagerung beider Erscheinungsgruppen.

In immer steigendem Maße haben aber die Untersuchungen der letzten Jahre die Bedeutung der hormonalen Stoffwechselregulation ins Licht gesetzt. Hier sind nun schon verschiedene Brücken von den Vitaminen über endokrine Drüsen zu den Stoffwechselvorgängen geschlagen worden. So hat *Erdheim*[3]) nachgewiesen, daß bei der Rachitis, die wenigstens zum Teil eine Avitaminose ist, die Beischilddrüsen eine außerordentlich ausgeprägte Massenzunahme erfahren. Ähnliche Erscheinungen finden sich nun auch an den Nebennieren von an B-Avitaminose erkrankten Tieren. *MacCarrison*[4]) beobachtete zuerst, daß bei der Vogelberiberi, bei der alle Organe an Masse einbüßen, einzig die Nebennieren hypertrophieren. Er glaubte auch, eine Zunahme des Adrenalingehalts festgestellt zu haben. Diese letzte Angabe konnte von *Verzars* Schüler *v. Beznak*[5]) und von *Kenji* und *Komatsu*[6]) nicht bestätigt werden, der Befund einer Nebennierenvergrößerung wurde aber immer wieder erhoben und von *Verzar* und *Peter*[7]) auf eine Hypertrophie der Rinde zurückgeführt, die ihren Bestand um etwa 50 Proz. vergrößert. Wie die Nebenniere bzw. ihr Rindenanteil in quantitativer

---

1) *W. Hess*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **117**, 284, 1921; **119**, 176, 1922.
2) *Abderhalden*, Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **187**, 180, 1921.
3) *Erdheim*, Denkschriften d. Kaiserlichen Akademie der Wissenschaften zu Wien, Math.-nat. Klasse **90**, 365, 1914.
4) *MacCarrison*, Proc. Roy. Soc. London, Ser. B, **91**, 103, 1920.
5) *v. Beznak*, diese Zeitschr. **140**, 1, 1923.
6) *Kenji* und *Komatsu*, zitiert bei *Verzar* und *Peter*.
7) *Verzar* und *Peter*, Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **208**, 659, 1924.

Hinsicht eine gegensätzliche Stellung zu allen anderen Organen zeigt, so verhält sie sich auch in qualitativer Richtung verschieden, indem sie als einziges Organ ihren Cholesterinbestand nicht vermehrt, sondern herabsetzt[1]). Ein typisches Gegenbeispiel ist der Hoden, der seine Masse stark einschränkt, seinen Cholesteringehalt aber vermehrt.

Dieses gegensätzliche Verhalten kann nicht zufällig sein, sondern es weist mit aller Schärfe darauf hin, daß die Nebennierenrinde am Zustandekommen der Beriberierscheinungen beteiligt sein muß. *Erdheim* hat in der Hypertrophie der Epithelkörperchen bei der Rachitis den Versuch einer Anpassung an vermehrte Ansprüche gesehen. Es lag nahe, diese Auffassung auf die Nebenniere bei der Beriberi zu übertragen. Wenn sie berechtigt ist, so enthält sie die Möglichkeit, die Nebenniere auf opotherapeutischem Wege zu entlasten, und es erschien möglich, daß dadurch die Hypertrophie unterdrückt, vielleicht auch die allgemeinen Krankheitserscheinungen in irgend einer Weise beeinflußt würden. Eine Entscheidung darüber, ob die avitaminotische Nebenniere normale oder Unterfunktion zeigt, war freilich auf diesem Wege nicht zu gewinnen. Es mußte damit auch unsicher bleiben, ob bei der B-Avitaminose die Nebenniere das primär geschädigte Organ ist, oder ob sie in der Tat anderen, geschädigten Organen bei eigener normaler Funktion zu Hilfe kommt.

Wir haben es uns zur Aufgabe gemacht, die Veränderungen zu studieren, die im Krankheitsbild der Vogelberiberi, speziell den Nebennierenerscheinungen, eintreten, wenn die Darreichung der B-vitaminfreien Nahrung mit der von Nebennierensubstanz kombiniert wird. Die Befunde von *MacCarrison* hätten an sich den Versuch einer Adrenalinbehandlung nahegelegt, wir glaubten aber, da sie keine Bestätigung gefunden haben, diese Behandlung zunächst zurückstellen zu können und wendeten uns den eigentlichen Organpräparaten zu. Zur oralen Darreichung wählten wir Suprenototal und Cortisupren, getrocknete Nebennieren- bzw. Nebennierenrindensubstanz in Pillenform. Da vom Adrenalin bekannt ist, daß es beim Wege durch den Verdauungskanal zerstört wird und ähnliches Verhalten immerhin auch für andere Bestandteile der Nebenniere im Bereich des Möglichen lag, stellten wir außerdem noch eine Versuchsreihe an, in der Suprenototalextrakte subkutan injiziert wurden. Sie enthielten die aus dem Alkoholätherextrakt des Organs durch Essigsäure isolierten wasserlöslichen Bestandteile. Für die Überlassung der Präparate sind wir der Firma Dr. *Laboschin* A.-G. zu Dank verpflichtet.

Unsere Versuchstiere waren ausgewachsene Tauben von 300 bis 400 g Gewicht. In den Avitaminosereihen wurde lediglich bester Reis verabreicht,

[1]) *K. Hotta*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **136, 1, 1924.**



der Korn für Korn verlesen war, sowie Wasser nach Belieben. Die anderen Gruppen erhielten käufliches Taubenmischfutter, bei dem sie gut gediehen. Jede der Tiergruppen saß in einem besonderen Schlag, der täglich gereinigt wurde. Aus unserem Plan ergaben sich folgende Reihen:

I. Normale Kontrolltiere ohne jede Behandlung (3 Tiere).
II. Normale Kontrolltiere mit Suprenototalinjektion (3 Tiere).
III. Normale Kontrolltiere mit Suprenototalfütterung (3 Tiere).
IV. Normale Kontrolltiere mit Cortisuprenfütterung (3 Tiere).
V. Unbehandelte Avitaminosetiere (7 Tiere).
VI. Avitaminosetiere mit Suprenototalinjektion (4 Tiere).
VII. Avitaminosetiere mit Suprenototalfütterung (3 Tiere).
VIII. Avitaminosetiere mit Cortisuprenfütterung (3 Tiere).

Unsere Beobachtungen erstreckten sich auf das allgemeine klinische Verhalten, auf die Gewichtsverhältnisse von Nebennieren und Hoden und endlich auf die Schwankungen der verschiedenen Lipoidfraktionen im Blute. Die Cholesterinvermehrung im Blute von beriberikranken Tauben ist nach den Untersuchungen von *Lawaczek*[1]) ein so regelmäßiger Befund, daß ihr Ausmaß als gegebener Maßstab für das Fortschreiten und eine eventuelle Beeinflussung der Erkrankung erschien. Weniger klar liegen die Verhältnisse der Phosphatide des Blutes. Für die Organe hat *Ciaccio*[2]) nachgewiesen, daß der Lipoidphosphor stark abnimmt und daß das Verhältnis der Fettsäuren zu ihm ebenfalls sinkt. Im Blute fanden *Ciaccio* und *Jemma*[3]), daß bei Tauben die Phosphatide deutlich zunahmen, bei Hunden dagegen sich verminderten. Neuerdings hat *Kodama*[4]) ähnliche Untersuchungen am Blute von Hähnen angestellt, in deren Futter zum Teil polierter, zum Teil ungeschälter Reis vorkam. Unter den sechs von ihm angegebenen Phosphatidwerten des Avitaminoseblutes finden sich vier, die denen des normalen Hühnerbluts gleich sind, nur zwei liegen erheblich tiefer. Bei B-vitaminfrei ernährten Kaninchen fand *Iwatsuru*[5]) anfangs auch die Phosphatide gesteigert, während sie später absanken. Wir hatten die Vermutung, daß die scheinbaren Unterschiede im Verhalten so nahe verwandter Tierarten, wie es Tauben und Hühner sind, vielleicht dadurch zustande gekommen sein könnten, daß nur einmalige Untersuchungen vorgenommen wurden und die Probenahmen in verschiedenen Stadien der Erkrankung vorgenommen sein konnten. Wir entschlossen uns daher, die Blutlipoide fortlaufend zu untersuchen. Im allgemeinen bedienten wir uns der *Bloor*schen Methoden, führten aber die Cholesterinbestimmungen im *Autenrieth*schen Kolorimeter zu Ende und verwendeten zur Phosphatidphosphorbestimmung die *Briggs*sche Modifikation des *Bell-Doisy*-Verfahrens. (Die Modifikation von *Fiske*, die wir inzwischen mit ausgezeichnetem Erfolg erprobten, erschien erst, als unsere Versuche schon einigermaßen fortgeschritten waren.) Die Blutentnahmen erfolgten durch Venaesectio am Bein. Man kann so bequem 2 ccm entnehmen und die Operation allwöchentlich wiederholen.

---

[1]) *Lawaczek*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **125**, 229, 1923.
[2]) Annali di clinica medica **10**, 60, 1920.
[3]) *Ciaccio* und *Jemma*, ebendaselbst **11**, 260, 1921.
[4]) *Kodama*, Journ. of Biochem. **5**, 185, 1925.
[5]) *Iwatsuru*, Arch. f. d. ges. Physiol. **208**, 41, 1925.



Ergebnisse.

Sämtliche Normaltauben, sowohl die unbehandelten wie die mit Nebennierenpräparaten gefütterten oder subkutan gespritzten, boten in allen Stadien des Versuchs ein vollkommen normales Bild. Die unbehandelten Beriberitauben zeigten die bekannten Erscheinungen, geduckte Haltung und gesträubtes Gefieder, ataktischen Gang, leichte Krämpfe. Zur Ausbildung ganz schwerer Krämpfe und von Opisthotonus, wie wir ihn sonst meist auftreten sehen, kam es nur vereinzelt, da der Versuch aus äußeren Gründen nach 21 tägiger Dauer abgebrochen werden mußte. In einigen Fällen bemerkten wir, nachdem die Reisfütterung etwa eine Woche oder etwas länger gedauert hatte, eine Neigung zur Einnahme einer Steilstellung, wie sie *Embden* und *Hotta*[1]) bei Cholesterin-Reisfütterung beobachtet haben. Sie ging bald wieder vorüber. Möglicherweise steht sie mit beginnenden Veränderungen in der Zusammensetzung der Organe in Verbindung, wir konnten jedoch diesmal darüber keine Untersuchungen anstellen.

Die nachstehende Tabelle I gibt eine Übersicht über die Gewichte der Nebennieren und bei den männlichen Tieren der Hoden nach Abschluß des Versuchs.

Bei unseren unbehandelten Normaltieren bewegt sich das Gewicht der Bulben zwischen 1,1076 und 1,1747 g, das der Nebennieren zwischen 0,0304 und 0,0364 g, der Hoden des einzigen Männchens wog 1,5149 g. Das Gewicht der Nebennieren stand zu dem der Bulbi im Verhältnis von 2,59 bis 3,09, während *v. Beznak* einen etwas höheren Mittelwert von 3,6 angibt. Unter dem Einfluß der verschiedenen Nebennierenpräparate finden ausgiebige und regelmäßige Veränderungen der Größenverhältnisse augenscheinlich nicht statt. Unter den mit Suprenototalinjektionen behandelten Normaltieren findet sich eins (Nr. 63), bei dem das Gewichtsverhältnis 4,09 beträgt. Hier ist das Gewicht des Bulbus normal, das der Nebenniere für ein Normaltier auffällig hoch (0,0449 g, während sonst keine normale Nebenniere über 0,0371 g gesehen wurde). Wir können nicht entscheiden, ob dieses vereinzelte hohe Gewicht, das in der Tat schon an Hypertrophie grenzt, irgend etwas mit der Nebennierenmedikation zu tun hat. In den später erwähnten Versuchen an Beriberitauben hatten die Suprenototalinjektionen den entgegengesetzten Effekt.

Jedenfalls erscheint es nach unseren an Normaltieren erhaltenen Zahlen ausgeschlossen, daß bei irgend einer der von uns angewandten Formen der Nebennierenverabreichung eine Reduktion der Nebennierenmasse des behandelten Tieres stattfindet.

Bei den Beriberitauben lag das Gewicht der Nebennieren nie unter 40 mg, meist erheblich über diesem Werte und stieg bis zu 66,7 mg bei Taube Nr. 82. Das Verhältnis zum Bulbusgewicht lag nur in einem Falle, mit 2,98, unter 3, erhob sich aber bis über 5. Diese Steigerungen erreichen noch nicht die stärksten von *v. Beznak* erhaltenen, auch hier ist aber wohl wieder die kurze Dauer unseres Versuchs verantwortlich zu machen, die die Krankheitserscheinungen nicht bis zur vollen Höhe sich ausbilden ließ.

---

[1]) *Hotta*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **126**, 1, 1924.



Tabelle I.

Nr.	Gewicht von Bulbus	Gewicht von Nebenniere	Nebenniere : Bulbus	Bemerkungen
79	1,1172	0,0304	2,59	Unbehandeltes Normaltier
80	1,1076	0,0304	2,75	Desgleichen
81	1,1747	0,0364	3,09	"
63	1,0973	0,0449	4,09	Normal, tägl. 1 ccm Suprenototal intramuskulär
68	1,1516	0,0351	3,03	Desgleichen
72	1,1082	0,0352	3,17	"
64	1,1296	0,0251	2,22	Normal, tägl. 1 Pille Suprenototal
68	—	—	—	Desgleichen
72	1,1082	0,0352	3,24	"
75	1,2325	0,0354	2,87	Normal, tägl. 1 Pille Cortisupren
76	1,3039	0,0287	2,18	Desgleichen
78	1,1352	0,0371	3,26	"
82	1,1928	0,0667	5,57	22 Tage Reisfütterung, sonst unbehandelt.
83	1,0401	0,0420	4,03	Desgleichen
84	1,1442	0,0445	3,89	"
85	1,3536	0,0404	2,98	"
86	—	—	—	"
87	1,1039	0,0502	4,54	"
89	1,2630	0,0454	3,59	"
61	1,3508	0,0401	2,96	Reisfütterung, tägl. 1 ccm Suprenototal intramuskulär
65	1,2156	0,0317	2,49	Desgleichen
69	1,1732	0,0317	2,49	"
88	—	—	—	" am 18. Tage eingegangen
62	1,2510	0,0442	3,56	Reisfütterung, tägl. 1 Pille Suprenototal
66	1,2638	0,0407	3,22	Desgleichen
70	1,1598	0,0434	3,75	"
73	1,1133	0,0369	3,30	Reisfütterung, tägl. 1 Pille Cortisupren
74	1,2042	0,0476	3,89	Desgleichen
77	1,1629	0,0925	7,95	"

Von den beiden Männchen dieser Gruppen besaß das eine, unbehandelte, ein Hodengewicht von 1,5149 g = 136,5 Proz. des Bulbus, das andere, das mit Cortisupren per os behandelt war, ein solches von 1,2474 g = 101,1 Proz. des Bulbus.

Durch Fütterung mit Suprenototal oder Cortisupren gelingt es nicht, das Gewicht der Nebennieren niedrig zu halten. Die absoluten Zahlen lagen mit einer Ausnahme über 40 mg. Diese, Nr. 73, betraf unser jüngstes und schwächstes Tier mit einem Anfangsgewicht von nur 290 g. Die Verhältniszahlen liegen um 3,5, bei Nr. 77 wird sogar der Höchstwert von allen, 7,95, erreicht.

Anders bei subkutaner Verabreichung des Präparats. Von den drei in dieser Weise behandelten Tieren erreicht nur eins, Nr. 61, ein Nebennierengewicht von 40 mg. Das Verhältnis des Gewichts zu dem des Bulbus ist aber auch hier wie bei den beiden anderen Tieren dieser Gruppe ein niedrig-normales: 2,96 gegenüber 2,49 und 2,54 bei den beiden anderen

Tieren. Durch die Suprenototalinjektionen gelang es also in allen Fällen, eine Hypertrophie der Nebennieren zu verhindern, während bei der Verfütterung von Cortisupren und Suprenototal diese Wirkung teils mit Sicherheit fehlt, teils höchstens angedeutet ist. Wir konnten bei den Tauben dieser Serie als einzigen der mit poliertem Reis gefütterten auch äußerlich keine polyneuritischen Erscheinungen feststellen.

Unsere Blutanalysen konnten wir nur an Gesamtblut ausführen, da wir die zur Gewinnung von Plasma nötigen Blutmengen nicht entnehmen konnten. Ihre Ergebnisse stellen wir in den folgenden Tabellen, die auch die Gewichtskurven der Tiere enthalten, zusammen.

Die Zahlen der Tabelle II ergeben für sämtliche Normaltiere, sowohl unbehandelte wie behandelte, Cholesterinwerte von 0,197 bis 0,285 Proz., wobei Werte oberhalb von 0,250 Proz. nur ausnahmsweise, und zwar vorwiegend gegen Schluß des Versuchs, vorkommen. Sie finden sich vor allem bei den Tieren, die zugleich erhebliche Anstiege der Gesamtfettsäuren aufweisen (Nr. 76, 78), und sind wohl eine Folge gesteigerten Umlaufs von Neutralfett. Auf einen Steringehalt der von uns verwendeten Nebennierenpräparate lassen sich die Erhöhungen nicht zurückführen, da diese sich bei der Untersuchung als sehr cholesterinarm erwiesen und nur in kleiner Menge zugeführt wurden. Die Menge der Neutralfette, die nach den Gesamtfettsäurewerten zu Beginn des Versuchs annähernd gleich der Phosphatidmenge war, steigerte sich vor allem bei den mit Cortisupren gefütterten Tieren. Es sieht, zumal wir bei zweien von den drei in dieser Weise behandelten Tieren nicht unerhebliche Gewichtsreduktionen feststellten, so aus, als ob hier eine Cortisuprenwirkung zutage träte. Da wir indessen nur über drei in dieser Weise behandelte Tiere verfügen, und in den weiter unten zu besprechenden Versuchen an Beriberitieren eine ähnliche Wirkung nicht eintrat, möchten wir ohne ausführlichere experimentelle Prüfung auf diese Frage nicht eingehen.

Der Phosphatidgehalt des Blutes der Normaltauben schwankte im allgemeinen zwischen 0,3 und 0,45 Proz., nur vereinzelt wurden niedrigere oder höhere Werte gefunden. Die Schwankungen sind immerhin recht beträchtlich, was sich zum Teil aus der Berechnung der Phosphatide aus dem Phosphorgehalt erklären dürfte, der nur 4 Proz. des Moleküls ausmacht. Bei einigen Tieren waren die wöchentlichen Schwankungen der Phosphatide sehr unbedeutend, bei anderen dagegen ziemlich ausgiebig, ohne daß darin eine bestimmte Regelmäßigkeit, etwa ein Einfluß der Gefangenschaftsdauer, der Fütterung, der Nebennierenfütterung zu erkennen wäre.

Tabelle III bringt unsere Befunde an mit poliertem Reis gefütterten Tauben mit und ohne Nebennierendarreichung. Bei den unbehandelten Tauben zeigt sich mit völliger Regelmäßigkeit eine Steigerung des Cholesteringehalts, die nach Ablauf der ersten Versuchswoche einsetzt und bis zu außerordentlich hohen Werten, bei Taube Nr. 83 bis zum 21. Tage zu einer Verdreifachung des Ausgangswertes, führt. Nur einmal lag der am Ende des Versuchs gemessene Wert deutlich unterhalb des am 21. Versuchstage gefundenen (Taube Nr. 85), war aber auch hier noch sehr stark über die Grenzen des Normalen gesteigert.

Das Verhalten der Gesamtfettsäuren war bei den Tieren dieser Reihe ein wechselndes, jedenfalls läßt sich weder eine mit der Versuchsdauer steigende oder fallende Tendenz regelmäßig feststellen. Beides kam vor, jedoch liegt z. B. bei Taube Nr. 86 der höchste Wert in der Mitte des Versuchs. Auch hier könnte wohl nur ein Versuch an umfangreicherem Tiermaterial

Tabelle II.
Lipoide im Blute von Normaltauben.

Nr.	Datum	Versuchstag	Cholesterin Proz.	Fettsäuren Proz.	Lecithin Proz.	Gewicht g	Bemerkungen
63	5. VII.	1.	0,250	0,318	0,268	390	Unbehandeltes Normaltier
	12. VII.	8.	0,222	0,598	0,470	410	
	19. VII.	15.	0,214	0,427	0,456	415	
	26. VII.	22.	0,242	0,588	0,469	—	
67	6. VII.	2.	0,197	0,445	—	290	Desgleichen
	14. VII.	8.	0,250	0,497	0,418	290	
	20. VII.	14.	0,250	0,356	0,327	315	
	26. VII.	21.	0,250	0,534	0,354	—	
71	7. VII.	3.	0,246	0,548	0,232	300	Desgleichen
	15. VII.	11.	0,264	0,455	0,422	300	
	20. VII.	17.	0,214	0,378	0,330	315	
	26. VII.	23.	0,285	0,572	0,417	—	
64	5. VII.	1.	0,268	0,440	—	300	Normaltier, tägl. 1 Pille Suprenototal
	12. VII.	8.	0,215	—	0,485	310	
	19. VII.	15.	0,231	0,435	0,417	310	
	28. VII.	24.	0,235	0,488	0,417	—	
68	6. VII.	1.	0,177	0,425	—	330	Desgleichen
	14. VII.	9.	0,195	0,477	0,450	320	
	21. VII.	16.	0,240	0,500	0,445	300	
	28. VII.	23.	0,240	0,497	0,483	—	
72	7. VII.	2.	0,267	0,456	0,216	250	Desgleichen
	15. VII.	10.	0,248	0,513	0,433	250	
	21. VII.	16.	0,268	0,353	0,383	250	
	28. VII.	23.	0,240	0,479	0,462	—	
75	8. VII.	1.	0,227	0,517	0,329	370	Normaltier, tägl. 1 Pille Cortisupren
	14. VII.	7.	0,195	0,500	0,417	380	
	20. VII.	13.	0,212	0,560	0,320	340	
	27. VII.	19.	0,250	—	0,417	—	
76	8. VII.	1.	0,204	0,504	0,312	410	Desgleichen
	16. VII.	9.	0,250	0,417	0,354	395	
	22. VII.	15.	0,267	0,785	0,338	340	
	27. VII.	20.	0,280	—	0,380	—	
78	9. VII.	1.	0,224	0,520	0,354	330	Desgleichen
	17. VII.	9.	0,264	0,733	0,465	330	
	22. VII.	14.	0,274	0,770	0,445	335	
	27. VII.	19.	0,280	—	0,502	—	
63	5. VII.	1.	0,250	0,318	—	390	Normaltier, tägl. 1 ccm Suprenototal intramuskulär
	12. VII.	8.	0,222	0,598	0,470	410	
	19. VII.	15.	0,214	0,427	0,456	415	
	26. VII.	22.	0,242	0,588	0,469	—	
67	6. VII.	2.	0,197	0,445	—	300	Desgleichen
	14. VII.	10.	0,250	0,597	0,418	300	
	20. VII.	16.	0,250	0,456	0,327	315	
	26. VII.	22.	0,250	0,534	0,354	—	
71	7. VII.	3.	0,246	0,548	—	200	Desgleichen
	15. VII.	11.	0,204	0,455	0,422	300	
	20. VII.	15.	0,214	0,378	0,330	315	
	26. VII.	21.	0,285	0,572	0,417	—	

Tabelle III.

Nr.	Datum	Versuchstag	Cholesterin Proz.	Fettsäuren Proz.	Phosphatide Proz.	Gewicht g	Bemerkungen
82	10. VII.	5.	0,224	0,691	—	310	Seit 5. VII. Reisfütterung
	16. VII.	11.	0,247	0,472	0,412	270	
	23. VII.	18.	0,365	0,497	0,500	220	
	26. VII.	21.	0,487	0,381	0,223	—	
83	9. VII.	4.	0,256	0,580	0,416	300	Desgleichen
	16. VII.	11.	0,300	0,442	0,379	250	
	22. VII.	18.	0,561	0,580	0,238	210	
	26. VII.	22.	0,834	—	0,238	—	
84	10. VII.	5.	0,207	—	0,417	310	Desgleichen
	17. VII.	12.	0,316	0,362	0,295	250	
	23. VII.	18.	0,455	0,442	0,264	217	
	26. VII.	21.	0,514	0,455	0,160	—	
85	12. VII.	7.	0,287	0,533	0,515	320	Desgleichen
	21. VII.	16.	0,540	0,540	0,350	275	
	28. VII.	23.	0,417	—	0,321	240	
86	15. VII.	10.	0,320	0,449	0,417	300	Desgleichen
	22. VII.	17.	0,405	0,649	0,189	290	
	28. VII.	23.	0,496	0,393	0,239	270	
87	10. VII.	5.	0,266	—	0,363	290	Desgleichen
	17. VII.	12.	0,347	0,546	0,402	240	
	23. VII.	18.	0,395	0,395	0,320	215	
	27. VII.	22.	0,377	0,320	0,283	—	
89	17. VII.	1.	0,247	0,652	0,446	365	Seit 17. VII. Reisfütterung
	23. VII.	6.	0,376	0,354	0,596	313	
	28. VII.	11.	0,381	0,465	0,417	—	
61	5. VII.	1.	0,240	0,296	0,223	280	Seit 1. VII. Reisfütterung, ab 5. VII. tägl. 1 ccm Suprenototal intramuskulär
	12. VII.	8.	0,182	0,526	0,347	236	
	19. VII.	15.	0,215	0,487	0,350	200	
	26. VII.	22.	0,222	0,371	0,331	—	
65	6. VII.	1.	0,193	0,376	—	310	Ab 6. VII. Suprenototal intramuskulär
	14. VII.	9.	0,242	0,598	0,354	252	
	19. VII.	14.	0,238	0,402	0,334	240	
	26. VII.	21.	0,202	0,504	0,339	—	
69	7. VII.	1.	0,330	0,572	0,325	300	Desgleichen
	15. VII.	8.	0,261	0,476	0,378	295	
	20. VII.	13.	0,273	0,475	0,397	265	
	26. VII.	19.	0,262	0,646	0,375	—	
88	17. VII.	1.	0,340	0,635	0,388	—	Ab 5. VII. Reisfutter, ab 17. VII. tägl. 1, ab 19. VII. 2 Ampullen Suprenototal intramuskulär
	23. VII.	6.	0,281	0,208	0,309	295	

Tabelle III (Fortsetzung).

Nr.	Datum	Versuchstag	Cholesterin Proz.	Fettsäuren Proz.	Phosphatide Proz.	Gewicht g	Bemerkungen
62	5. VII.	1. (8.)	0,268	0,316	—	—	Ab 1. VII. Reis, ab 5. VII. tägl. 1 Pille Suprenototal. Ab 22. VII. Krämpfe, Opisthotonus
	12. VII.	8. (15.)	0,203	0,564	0,392	300	
	19. VII.	15. (22.)	0,330	0,462	0,334	269	
	26. VII.	22. (29.)	0,581	0,507	0,237	247	
66	6. VII.	2.	0,177	0,363	—	—	Ab 5. VII. Reis, ab 6. VII. 1 Pille Suprenototal täglich
	14. VII.	10.	0,244	0,432	0,398	270	
	19. VII.	15.	0,300	0,338	0,371	220	
	28. VII.	24.	—	0,607	0,354	180	
70	7. VII.	3.	0,277	0,552	—	330	
	15. VII.	11.	0,316	0,727	0,490	312	
	21. VII.	17.	0,360	0,353	0,383	275	
	28. VII.	24.	0,396	0,607	0,417	—	
73	8. VII.	1. (4.)	0,244	0,548	0,308	290	Ab 5. VII. Reis, ab 9. VII. 1 ab 15. VII. 3 Cortisuprenpillen täglich
	14. VII.	7. (10.)	0,282	0,667	0,490	225	
	20. VII.	13. (16.)	0,304	0,449	0,278	—	
	27. VII.	20. (23.)	0,607	0,410	0,251	203	
74	8. VII.	1. (4.)	0,417	0,548	0,416	320	Ab 5. VII. Reis, ab 8. VII. 1 Pille Cortisupren täglich
	15. VII.	8. (11.)	0,410	0,667	0,422	295	
	21. VII.	14. (17.)	0,666	0,449	0,347	245	
	27. VII.	20. (23.)	0,607	0,410	0,322	—	
77	9. VII.	1. (5.)	0,307	0,715	0,440	320	Ab 5. VII. Reis, ab 9. VII. 1 Pille Cortisupren täglich
	16. VII.	8. (12.)	0,247	0,389	0,362	275	
	22. VII.	14. (16.)	0,506	0,760	0,308	240	
	27. VII.	19. (23.)	0,480	0,323	0,272	—	

und vor allem von längerer Ausdehnung eine etwa vorhandene Gesetzmäßigkeit aufdecken.

Unverkennbar ist aber bei den Phosphatiden die Tendenz, in der zweiten Versuchshälfte rasch abzusinken, und ausnahmslos ergab die letzte Untersuchung Werte, die tief unter der Norm gelegen sind. Bei Tier Nr. 89, das am 11. Versuchstage an der Blutentnahme zugrunde ging, ist dieses Stadium noch nicht erreicht. Hier wie bei Taube Nr. 82 ging der Senkung eine Steigerung des Phosphatidwertes voraus, die wir auch in der Reihe der behandelten Tiere (bei Taube Nr. 73) noch einmal wiederfanden. Es ist nicht unmöglich, daß wir hier eine häufiger auftretende, aber vorübergehende Erscheinung vor uns haben, die nur wegen der immer noch verhältnismäßig seltenen allwöchentlichen Untersuchung nicht öfter gefunden wurde.

Das Ergebnis der Fütterungsversuche mit Suprenototal und Cortisupren war beim Cholesterin eindeutig, daß keines der beiden Präparate die Steigerungen zu verhindern oder ihr Ausmaß zu verkleinern vermochte. Die Gesamtfettsäuren zeigen auch hier ein unregelmäßiges Verhalten.

Die Phosphatide zeigen zwar in allen Fällen sinkende Tendenz, jedoch scheint das Tempo der Verminderung ein langsameres zu sein als bei den unbehandelten Beriberitieren. Es ist demnach nicht ganz von der Hand zu weisen, daß vielleicht der Phosphatidstoffwechsel irgendwie auch durch orale Darreichung von Nebennierenpräparaten zu beeinflussen ist. Allerdings

müßte man dann annehmen, daß der Cholesterin- und Phosphatidstoffwechsel in diesem Falle unabhängig voneinander variieren, da wir ja bei dem ersteren keine Beeinflussung durch die gleichen Maßnahmen erkennen können.

Wenn man in den Fütterungsversuchen höchstens die Andeutung einer Beeinflussung des Lipoidstoffwechsels der B-vitaminfrei ernährten Tiere sehen kann, so tritt eine solche einwandfrei in den Versuchen zutage, in denen Suprenototalinjektionen verabreicht wurden. Hier hält sich bei allen Tieren das Cholesterin während der ganzen Dauer des Versuchs in seinen normalen Grenzen von 0,200 bis 0,270 Proz. Die beiden einzigen Werte oberhalb von 0,300 Proz. lagen an den Tagen, an denen die Suprenototalinjektionen begonnen wurden. Die Phosphatide liegen in allen Fällen um den normalen Wert von 0,350 Proz. herum, während der einzige Wert unter 0,3 Proz. wiederum am ersten Tage der Behandlung notiert wurde. Die Suprenototalinjektionen halten also gleichmäßig beide Lipoidfraktionen im Bereich des Normalen fest, indem sie beim Cholesterin die Steigerung, beim Phosphatid die Abnahme verhindern.

Zusammenfassend können wir sagen, daß die Injektion von Nebennierenextrakt bei mit poliertem Reis gefütterten Tauben das Auftreten von Avitaminoseerscheinungen zwar nicht ganz zu verhindern vermag — es bleiben z. B. die starken Gewichtsreduktionen —, daß es aber die Hypertrophie der Nebennieren, die Veränderungen in der Zusammensetzung der Blutlipoide und die neuritischen Symptome hintanhält. Von der Bedeutung der Nebennierenhypertrophie bei der B-Avitaminose hat man sich, seit sich *MacCarrisons* Befund einer verstärkten Adrenalinproduktion als irrig erwiesen hat, keine Vorstellung mehr machen können. Gehen wir noch einmal auf *Erdheims* Untersuchungen über die Hypertrophie der Epithelkörperchen zurück, so sehen wir, daß hier zwei Deutungen der Erscheinung diskutiert wurden: 1. Die Hypertrophie könnte der Ausdruck einer Unterfunktion und des Bestrebens sein, durch Massenvermehrung den sekretorischen Aufgaben gerecht zu werden. 2. Sie könnte einen vermehrten Anspruch des Organismus an die sekretorischen Leistungen der Epithelkörperchen anzeigen, dem ebenfalls durch eine Vermehrung des an sich normal funktionierenden Drüsengewebes entsprochen wird. *Erdheim* entscheidet sich [1]) für die zweite Möglichkeit, da er bei seinen histologischen Untersuchungen der hypertrophierten Epithelkörperchen keine Parenchymschädigung nachweisen konnte. Derartige Untersuchungen an der hypertrophierten Nebenniere von Beriberitieren fehlen bis jetzt, und auch wir mußten unseren Plan, sie anzustellen, einstweilen aus äußeren Gründen zurückstellen. Immerhin sprechen unsere chemischen Untersuchungen und Wägungsergebnisse dafür, daß die Ursachen für die Hypertrophie nicht in der Nebenniere selber gelegen sind, da die Versorgung der Organe mit Nebennierensubstanz sie verhindert.

---

[1]) *Erdheim*, a. a. O. S. 677.



Es erhebt sich weiter die Frage, ob wir berechtigt sind, einen Zusammenhang zwischen der Beeinflussung der Nebenniere und des Lipoidstoffwechsels anzunehmen. Beziehungen der Nebenniere zum Lipoidstoffwechsel werden von vielen Autoren angenommen und erscheinen sehr naheliegend wegen des außerordentlich hohen Gehalts des Organs sowohl an Cholesterin wie an Phosphatiden. Versuche haben gezeigt, daß der Lipoidgehalt der Nebenniere vom Blute aus zu beeinflussen ist; so nimmt beim Kaninchen die Nebennierenrinde bei Cholesterinfütterung bis zum Fünf- bis Sechsfachen zu, unter Erhöhung ihres Cholesteringehalts auf ein Mehrfaches[1]). Andererseits gehen auch von den Nebennieren Wirkungen auf den Fettstoffwechsel aus. Nach *Raab*[2]) bewirkt Adrenalin kurzdauernde Senkungen des Blutfettes, nach *Wertheimer*[3]) hemmt es die Umgruppierung der Fette unter Phlorrhizinwirkung und beschleunigt den Übergang der Fette in Kohlehydrat. Dem gegenüber steht allerdings, daß *Baumann* und *Holly*[4]) bei Kaninchen, die die beiderseitige Nebennierenexstirpation lange Zeit hindurch überleben, keine Veränderung der Blutlipoide fanden, solange das Allgemeinbefinden der Tiere ein gutes war, eine Feststellung, mit der sie sich allerdings in Gegensatz zu den Arbeiten der *Aschoff*schen Schule[5]) befinden. Jedenfalls lassen sich die Beziehungen der Nebenniere zum Fetthaushalt bis jetzt nicht auf eine einfache Formel bringen, und die darüber entwickelten Theorien haben sich nicht allgemein durchzusetzen vermocht. Wir möchten aber glauben, daß unsere Befunde deutlich für die Annahme solcher Zusammenhänge sprechen. Wir haben in allen Fällen zugleich mit der Hypertrophie der Nebennieren eine Steigerung des Cholesterins und eine Senkung der Phosphatide, in allen solchen, in denen die Hypertrophie nicht zustande kam, ein Verbleiben beider Lipoidfraktionen innerhalb der normalen Grenzen gesehen. Es erscheint uns gezwungen, einen Zusammenhang zwischen zwei unter den gleichen Umständen eintretenden, durch denselben Eingriff aufzuhebenden Erscheinungen in Abrede stellen zu wollen. Besonders möchten wir noch darauf hinweisen, daß die Gegenbewegung von Cholesterin und Phosphatid im Blute beriberikranker Tiere ein ganz einzigartiges Vorkommen ist, da wir sonst unter den mannigfaltigsten physiologischen und pathologischen Bedingungen beide Fraktionen, wenn auch nicht immer ganz gleich-

---

[1]) *Wacker* und *Hueck*, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **74**, 416, 1913.

[2]) *Raab*, Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **49**, 179, 1926.

[3]) *Wertheimer*, Arch. f. d. ges. Physiol. **213**, 280, 287, 1926.

[4]) *Baumann* und *Holly*, Journ. of biol. chem. **55**, 457, 1923; vgl. auch *Randkes* und *Knudson*, ebendaselbst **67**, 17, 1926.

[5]) *Rothschild*, Beitr. z. allgem. Pathol. u. path. Anat. **60**, 39, 1915; *Landau* und *MacNee*, ebendaselbst **58**, 667, 1914.

zeitig, so doch ganz gleichsinnig variieren sehen. Vielleicht geben gerade unsere Befunde ein neues Mittel an die Hand, die Bedeutung der Nebennieren für den Lipoidstoffwechsel zu prüfen.

Auf das Adrenalin werden wir allerdings die von uns beobachteten Wirkungen nicht zurückführen dürfen, denn seine chemischen Reaktionen fielen in unseren Extrakten negativ aus. Injektionen von 1 bis 2 ccm brachten bei Kaninchen keine deutliche Wirkung auf den Blutzuckergehalt zustande und Blutdruckbestimmungen am *Läwen-Trendelenburg*schen Präparat ergaben, daß der Adrenalingehalt des Extrakts kleiner war als 1 : 5000000. Unsere Tauben hätten also im Laufe von 20 Tagen höchstens $^4/_{1000}$ mg Adrenalin erhalten, eine Menge, die wohl, über einen so langen Zeitraum verteilt, kaum derartige Wirkungen hervorbringen könnte. Übrigens ist Herr cand. med. *H. J. Pollack* zurzeit mit einer Prüfung der Adrenalinwirkung bei Beriberitauben beschäftigt.

Wir sind demnach genötigt, in unseren Extrakten die Anwesenheit einer anderen, ihrem Wesen nach einstweilen unbekannten Wirksubstanz anzunehmen, die wir zwar noch nicht näher charakterisieren können, die aber wohlumschriebene Wirkungen zeitigt und sich in wässerige Lösung überführen läßt. Es ist das nicht die erste Beobachtung, die darauf hinweist, daß sich die hormonale Wirkung der Nebenniere nicht einfach auf das Adrenalin zurückführen läßt. So hat z. B. *Obré* die Erregbarkeit des motorischen Nerven durch Nebennierenextrakt, nicht aber durch Adrenalin steigern können[1]). Vielleicht kann das von uns angewandte Verfahren, das den Einfluß der Substanz an ihrem Ursprungsorgan zeigt, trotz seiner Weitläufigkeit bei weiterem Suchen als Wegweiser dienen.

---

[1]) *Obré*, C. r. de la soc. de biol. **88**, 585, 1923.

Über spektrophotometrische Bestimmung der Glucuronsäure.

Von

Georg Scheff (derzeit in Pécs).

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut der Königl. ungarischen Universität Budapest.)

(Eingegangen am 24. Januar 1927.)

Mit 1 Abbildung im Text.

Den quantitativen Bestimmungsmethoden der Glucuronsäure, soweit sie bisher vorgeschlagen wurden, mangelte es an einer reellen Grundlage, da z. B. bei den kolorimetrischen Methoden nicht die freie Säure, sondern das Lacton, oder verschiedene Salze, oder aber der betreffende Paarling als Vergleichsbasis diente; die verschiedenen Glucuronsäuren verhalten sich aber verschieden, daher mußte die bereits an und für sich komplizierte Methodik jeweils dem betreffenden Falle angepaßt werden.

Als es vor kurzem *Ehrlich* und *Rehorst*[1]) gelang, die freie Glucuronsäure kristallisiert darzustellen, konnte ich im Anschluß an meine zwei vor einiger Zeit veröffentlichten Arbeiten[2]) einen bereits seit längerer Zeit vorgefaßten Plan verwirklichen. Im Besitze reiner Präparate von freier Glucuronsäure konnte ich versuchen, meine auf der *Bial*schen Probe beruhende spektrophotometrische Methode, die ich zur Bestimmung der Pentosen vorgeschlagen habe, zur Bestimmung der Glucuronsäure auszuarbeiten. Dabei war es klar, daß dies nur möglich ist, wenn nicht nur die freie, sondern auch die gepaarte Glucuronsäure bzw. ihre Glucuronsäurekomponente, sich mit dem *Bial*schen Reagens unter den von mir vorgeschlagenen Bedingungen, zunächst wenigstens qualitativ, so verhält, wie die Pentosen. Das ist aber in der Tat der Fall!

Es wird zwar angegeben, daß die Orcinreaktion in der *Bial*schen Modifikation an der Glucuronsäure — im Gegensatz zu den Pentosen —

[1]) *F. Ehrlich* und *K. Rehorst*, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **58**, 1925.

[2]) *G. Scheff*, diese Zeitschr. **147**, 90, 94, 1924.



negativ ausfällt, und mag dies auch seine Richtigkeit haben. Indessen erwies sich bereits nach meinen ersten orientierenden Versuchen, daß Glucuronsäuren mit dem *Bial*schen Reagens dieselben Farbenreaktionen wie Pentosen geben, *wenn man die von mir vorgeschlagene Art und Dauer des Erhitzens übt.*

Um mein zur Bestimmung der Pentosen ausgearbeitetes Verfahren kurz zu wiederholen, verfahre ich wie folgt. 1 ccm der zu untersuchenden Lösung wird in einem Reagenzglas mit 4 ccm des *Bial*schen Reagens versetzt, das Reagenzglas in ein siedendes Wasserbad versenkt, daselbst 10 Minuten lang belassen, 3 Minuten lang unter dem Leitungswasserstrahl gekühlt, der entstandene grünblaue Farbstoff mit Amylalkohol extrahiert, den man aus einer Bürette zufließen läßt, und dessen Volumen genau abgelesen werden muß. Die Extraktion erfolgt durch mehrmaliges Umschwenken, nicht durch Schütteln! Nun wird der Extinktionskoeffizient des amylalkoholischen Auszugs, der nicht zu hell und nicht zu dunkel sein darf, bestimmt. Die gesuchte Konzentration kann jedoch nicht einfach auf Grund der Gleichung $c = \varepsilon A$ gefunden werden, wo ε den Extinktionskoeffizienten, A aber das für eine bestimmte Spektralstelle bei jeder Konzentration konstante Absorptionsverhältnis (*Vierordt*) bedeutet. Denn einerseits ist die Farbstoffbildung, daher auch das Absorptionsverhältnis der Pentosekonzentration *nicht* proportional, andererseits muß man, um spektrophotometrisch prüfbare amylalkoholische Lösungen zu erhalten, je nach der Intensität der entstandenen Farbenreaktion, bald mit mehr, bald mit weniger Amylalkohol ausschütteln. Hierzu kommt noch, daß der Amylalkohol beim Schütteln mit der wässerigen sauren Phase bestimmte Mengen von der letzteren aufnimmt und hierdurch merkbar an Volumen gewinnt. Allen diesen Umständen mußte dadurch Rechnung getragen werden, daß im Ausdruck $c = \varepsilon A$, das Absorptionsverhältnis A durch einen Wert K ersetzt wurde, der aber jeweils nur für eine ganz bestimmte Pentosekonzentration gültig ist. Die K-Werte habe ich an einer möglichst großen Zahl verschieden konzentrierter Pentoselösungen wie folgt ermittelt. Der nach obigem Vorgange in 1 ccm der zu untersuchenden Pentoselösung entstandene Farbstoff war nach der Extraktion nicht mehr in 1 ccm der wässerigen Lösung, sondern in v ccm Amylalkohol enthalten, dessen Volumen zudem noch durch Aufnahme von der wässerigen Säure auf $f \,.\, v$ vergrößert war. Dann ist aber die gesuchte Konzentration nicht $c = \varepsilon K$, sondern um so vieles größer, als anstatt 1 ccm des Lösungsmittels nunmehr $v \,.\, f$ ccm vorhanden waren, daher $c = \varepsilon \,.\, v \,.\, f \,.\, K$ bzw., da ja zunächst der Wert von K bestimmt werden sollte,

$$K = \frac{c}{v \,.\, f \,.\, \varepsilon}\,.$$

Versuche mit Glucuronsäure.

Die Darstellung des mentholglucuronsauren Ammoniums erfolgte nach der von *Neuberg* und *Lachmann*[1]) beschriebenen Methode. Der in üblicher Weise gewonnene Mentholharn von Kaninchen wird am Wasserbad auf ein Drittel eingeengt, von den eventuell im Laufe der Aus-

[1]) *C. Neuberg* und *Lachmann*, diese Zeitschr. **24**, 418, 1910.

kühlung ausgeschiedenen Salzen dekantiert, mit Essigsäure gut angesäuert und mit Äther öfters ausgeschüttelt. Die vereinigten Ätherauszüge werden abdestilliert, bis bloß ein wässeriger Rückstand verbleibt, der die Mentholglucuronsäure gelöst enthält. Unter Kühlung wird nur konzentriertes Ammoniak tropfenweise so lange zugesetzt, bis das mentholglucuronsaure Ammonium vollständig ausgeschieden wird. Den Niederschlag bringt man aufs Filter, wäscht mit ammoniakalischem Wasser nach und läßt trocknen. Zur Umkristallisation löst man in Wasser, dekoloriert mit wenig Tierkohle, filtriert, säuert mit Essigsäure wieder an und schüttelt mit Äther aus und fährt wie oben fort. Die Umkristallisation läßt sich, abgesehen von geringen Verlusten, mit guter Ausbeute wiederholen, und man gelangt bereits beim erstenmal zu einem glänzend weißen Präparat. Das reine mentholglucuronsaure Ammonium läßt sich im Vakuum über Schwefelsäure bis zur Gewichtskonstanz trocknen, und daß hierbei sich nur das überflüssige Ammoniak verflüchtigt, das Salz aber wochenlang unverändert bleibt, ging aus von Zeit zu Zeit wiederholten, nach *Kjeldahl* ausgeführten N-Bestimmungen hervor, wobei ich einmal statt des berechneten Wertes von 0,04545 g einen solchen von 0,04536 g und 1 Woche später am gleichen Präparat anstatt 0,05050 g einen Wert von 0,05043 g erhielt. Dieses Resultat spricht entschieden gegen einen Verlust von Ammoniak aus dem Verband mit der Säure. Schmelzpunktbestimmungen führten zu keinem brauchbaren Ergebnis, denn es kam bloß zu einem allmählichen Sintern und bei etwa 175° C zu einer Bräunung der Substanz.

Bezüglich der Darstellung der freien d-Glucuronsäure und dessen Kristallisation verweise ich auf die Originalmitteilung der oben genannten Autoren. Hier sei bloß kurz darauf hingewiesen, daß das Wesentliche in dieser verbesserten Methode in der Spaltung der gepaarten Glucuronsäureverbindung zu suchen ist, die nicht unter Druck, wie gewöhnlich, sondern bei Wasserbadtemperatur mit verdünnter Schwefelsäure vollzogen wird. Die Schwefelsäure wird mit überschüssigem Barytwasser oder Bariumcarbonat entfernt, wobei die d-Glucuronsäure vollständig in das Bariumsalz übergeht. Dieses wird durch Alkohol gefällt, in Wasser gelöst, bei mäßiger Wärme mit weniger als der berechneten Menge verdünnter Schwefelsäure zerlegt, die Flüssigkeit vorsichtig verdampft und der verbliebene Sirup mit Alkohol extrahiert (wobei das unzerlegte Bariumsalz wieder ausfällt) und der alkoholische Extrakt eingeengt. Dabei erhält man sofort ein kristallisierendes Produkt, das nur aus freier d-Glucuronsäure besteht. Die umkristallisierte Säure läßt sich gleichfalls im Vakuum über Schwefelsäure bis zur Gewichtskonstanz trocknen.

Die in einem reichsdeutschen Laboratorium ausgeführte Analyse ergab sowohl an den mir von den Herren *Ehrlich* und *Rehorst* zugesandten, wie auch an zwei eigenen Präparaten Werte, die mit den aus der Formel berechneten recht gut übereinstimmten.

	C Proz.	H Proz.	Berechnet
Präparat von *Ehrlich* und *Rehorst*	37,17 37,15	5,36 5,48	
Eigenes Präparat I	36,82 36,84	5,21 5,24	C = 37,11 Proz. H = 5,20 „
Eigenes Präparat II	37,64 37,62	5,15 5,22	

Bei den bekannt nahen Beziehungen zwischen Pentosen und Glucuronsäure war es zu erwarten, daß in der amylalkoholischen Lösung von Pentosen einerseits und der Glucuronsäure andererseits der Verlauf der Lichtabsorption längs des sichtbaren Spektrums zum mindesten ein ähnlicher sein wird, was in der Tat der Fall war. Ich habe zunächst, um den Verlauf der Absorptionskurve festzustellen, die Extinktionskoeffizienten bezüglich der freien Glucuronsäure genau in denselben Spektralintervallen bestimmt, wie seinerzeit an den Pentosen, und wie aus nachstehender Tabelle I ersichtlich

Tabelle I.

Spektralstelle	d-Glucuronsäure	
$\mu\mu$	Präparat I	Präparat II
648,2	0,849	0,954
641,5	0,881	0,985
634,7	0,936	1,041
628,0	1,017	1,121
621,3	1,074	1,159
617,7	1,138	1,212
615,4	1,110	1,185
609,7	1,084	1,159
598,2	0,940	1,015
587,6	0,855	—
573,4	0,795	0,899

das Maximum der Lichtabsorption genau an derselben Stelle, bei 617,7 $\mu\mu$, wie an der Arabinose gefunden. Es war also wohl gerechtfertigt, die weiteren Bestimmungen, da ja ihre Ergebnisse mit den seinerzeit an den Pentosen erhaltenen verglichen werden sollten, wieder an der Stelle jenes Absorptionsmaximums auszuführen.

Nun galt es, unter ganz identischen Bedingungen die K-Werte, sowohl für die freie Glucuronsäure, wie auch für das mentholglucuronsaure Ammonium zu ermitteln, und war es zu erwarten, daß, wenn Hydrolysenprodukte nicht störend einwirken, das Salz der gepaarten Säure dieselben Werte liefert, sofern man diese auf den Gehalt des Salzes an reiner Glucuronsäure bezieht. In nachstehender Tabelle II sind die Ergebnisse aller dieser Bestimmungen nach ansteigenden Konzentrationen der untersuchten Lösungen geordnet, und zwar so, daß am mentholglucuronsauren Ammonium nicht der Gehalt der Lösung an der gepaarten, sondern an der freien Glucuronsäure maßgebend war. Daten und Ergebnisse dieser Bestimmungen sind in nachstehender Tabelle II zusammengestellt, und enthält der letzte Stab die Werte von K, die für je eine Konzentration charakteristisch sind.

Tabelle II.

K-Werte für d-Glucuronsäure.

Verwendete Glucuronsäure	Konzentration an freier Glucuronsäure Proz.	Zur Extraktion verwendeter Amylalkohol (v) ccm	Faktor für die Volumenzunahme des Amylalkohols (f)	$K = \frac{c}{f \cdot v \cdot s}$
Frei	0,0695	8,0	1,26	0,00769
„	0,0869	6,0	1,27	0,00913
„	0,0948	6,3	1,27	0,00980
„	0,104	8,0	1,26	0,0104
Gepaart 0,199 Proz. . .	0,111	9,0	1,26	0,0109
Frei	0,115	11,0	1,24	0,0114
„	0,130	8,0	1,26	0,0124
„	0,144	10,5	1,245	0,0134
Gepaart 0,265 Proz. . .	0,148	9,5	1,25	0,0138
Frei	0,174	9,0	1,26	0,0155
Gepaart 0,319 Proz. . .	0,177	10,0	1,25	0,0151
Frei	0,178	10,0	1,25	0,0161
„	0,189	8,0	1,26	0,0170
Gepaart 0,356 Proz. . .	0,198	10,0	1,25	0,0172
Frei	0,217	10,0	1,25	0,0187
Gepaart 0,398 Proz. . .	0,222	10,0	1,25	0,0194
Frei	0,231	10,5	1,245	0,0200
„	0,256	10,0	1,25	0,0222
Gepaart 0,510 Proz. . .	0,283	10,3	1,25	0,0237
„ 0,517 „ . .	0,288	11,0	1,24	0,0240
Frei	0,289	10,0	1,25	0,0238
Gepaart 0,560 Proz. . .	0,311	10,0	1,25	0,0259
Frei	0,316	10,0	1,25	0,0266
„	0,348	11,0	1,24	0,0286
Gepaart 0,637 Proz. . .	0,354	10,5	1,245	0,0291
Frei	0,379	10,0	1,25	0,0310
„	0,385	11,0	1,24	0,0309
„	0,392	11,0	1,24	0,0315
Gepaart 0,713 Proz. . .	0,396	10,0	1,25	0,0309
Frei	0,435	11,0	1,24	0,0348
Gepaart 0,796 Proz. . .	0,443	11,5	1,24	0,0346
Frei	0,462	12,0	1,24	0,0350
„	0,474	11,0	1,24	0,0366
Gepaart 0,864 Proz. . .	0,480	12,0	1,24	0,0377
„ 0,892 „ . .	0,496	11,5	1,24	0,0378
„ 0,919 „ . .	0,511	12,0	1,24	0,0391
Frei	0,564	11,5	1,24	0,0423
„	0,615	13,5	1,23	0,0434
„	0,634	12,0	1,24	0,0463
„	0,695	12,0	1,24	0,0499
„	0,758	14,0	1,23	0,0528
„	0,868	12,0	1,24	0,0572
„	0,869	12,0	1,24	0,0575

Diese Werte wurden auch als Ordinaten in ein Koordinatensystem eingetragen, das die Konzentration der verwendeten Lösungen auf der Abszissenachse verzeichnet enthält und durch die Schnittpunkte



die nachstehend abgebildete Kurve gezogen; gleichzeitig aber auch, um einen Vergleich zu erleichtern, auf Grund der in meiner erwähnten Mitteilung enthaltenen Daten die entsprechenden Kurven für Arabinose und Xylose abgebildet.

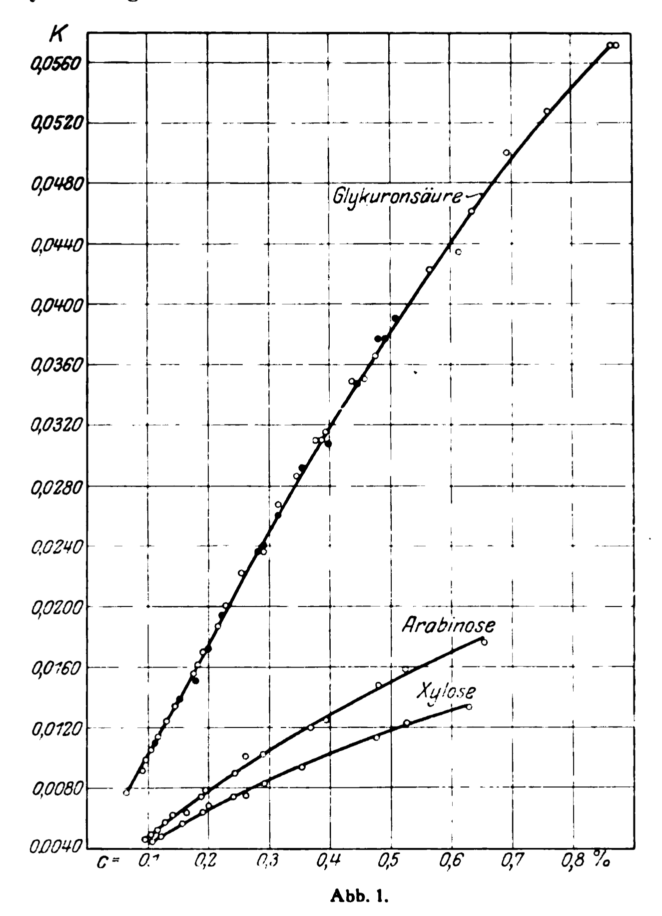


Abb. 1.

Man sieht aus den einander folgenden K-Werten in der Tabelle II, wie auch an der Kurve, daß die der gepaarten Säure angehörenden Werte mit hinreichender Genauigkeit in die Reihe bzw. in die Kurve fallen, in der auch die Werte der freien Säure[1]) enthalten sind, so daß sicher ausgesagt werden kann, daß sich die *gepaarten Glucuronsäuren in der von mir verwendeten Modifikation der Bialschen Probe qualitativ und quantitativ so verhalten, wie die freie Säure.*

[1]) Die auf die freie Säure bezüglichen Werte sind mit Ringen bezeichnet.

Tabelle III.

Konzentration Proz.	$K\left(=\frac{c}{v.f.\varepsilon}\right)$	Konzentration Proz.	$K\left(=\frac{c}{v.f.\varepsilon}\right)$
0,10	0,0100	0,46	0,0356
0,11	0,0108	0,47	0,0362
0,12	0,0115	0,48	0,0369
0,13	0,0123	0,49	0,0375
0,14	0,0130	0,50	0,0381
0,15	0,0138	0,51	0,0387
0,16	0,0145	0,52	0,0393
0,17	0,0153	0,53	0,0399
0,18	0,0160	0,54	0,0405
0,19	0,0168	0,55	0,0411
0,20	0,0175	0,56	0,0417
0,21	0,0183	0,57	0,0423
0,22	0,0190	0,58	0,0429
0,23	0,0198	0,59	0,0435
0,24	0,0205	0,60	0,0441
0,25	0,0213	0,61	0,0447
0,26	0,0220	0,62	0,0452
0,27	0,0227	0,63	0,0458
0,28	0,0232	0,64	0,0463
0,29	0,0241	0,65	0,0469
0,30	0,0248	0,66	0,0474
0,31	0,0255	0,67	0,0480
0,32	0,0261	0,68	0,0485
0,33	0,0268	0,69	0,0491
0,34	0,0275	0,70	0,0496
0,35	0,0282	0,71	0,0501
0,36	0,0289	0,72	0,0506
0,37	0,0296	0,73	0,0511
0,38	0,0303	0,74	0,0515
0,39	0,0310	0,75	0,0520
0,40	0,0316	0,76	0,0525
0,41	0,0323	0,77	0,0529
0,42	0,0330	0,78	0,0534
0,43	0,0336	0,79	0,0539
0,44	0,0343	0,80	0,0543
0,45	0,0349		

Einmal im Besitz der Glucuronsäurekurve, habe ich für die Glucuronsäurekonzentration von 0,10 bis 0,80 Proz. alle zugehörigen K-Werte, teils durch graphische, teils durch lineare Interpolation erhalten und die betreffenden Werte in Tabelle III zusammengestellt.

Auf Grund der Gleichung $K = \frac{c}{v.f.\varepsilon}$ bzw. $v.f.\varepsilon = \frac{c}{K}$ konnte ich dann ohne weiteres den zu jeder Konzentration gehörenden Wert von $v.f.\varepsilon$ berechnen. Diese Werte sind in Tabelle IV zusammengestellt.

Man wird also, um die Konzentration einer Lösung von freier Glucuronsäure oder von mentholglucuronsaurem Ammonium zu bestimmen,

Tabelle IV.

Konzentration Proz.	$v \cdot f \cdot \varepsilon$	Konzentration Proz.	$v \cdot f \cdot \varepsilon$
0,10	10,0	0,34	12,4
0,105	10,1	0,36	12,5
0,11	10,2	0,38	12,6
0,115	10,3	0,40	12,7
0,12	10,4	0,43	12,8
0,125	10,5	0,45	12,9
0,13	10,6	0,47	13,0
0,135	10,7	0,49	13,1
0,14	10,8	0,51	13,2
0,145	10,9	0,53	13,3
0,15	11,0	0,55	13,4
0,16	11,1	0,57	13,5
0,17	11,2	0,59	13,6
0,18	11,3	0,61	13,7
0,19	11,4	0,63	13,8
0,20	11,5	0,65	13,9
0,215	11,6	0,67	14,0
0,225	11,7	0,69	14,1
0,235	11,8	0,71	14,2
0,245	11,9	0,73	14,3
0,27	12,0	0,75	14,4
0,29	12,1	0,76	14,5
0,31	12,2	0,78	14,6
0,32	12,3	0,80	14,7

Tabelle V.

Zu 5 ccm der HCl-Orcin-Pentose- bzw. Glucuronsäure-lösung hinzugefügter Amylalkohol v	f	Zu 5 ccm der HCl-Orcin-Pentose- bzw. Glucuronsäure-lösung hinzugefügter Amylalkohol v	f
4	1,28	18	1,20
5	1,28	19	1,20
6	1,27	20	1,19
7	1,27	21	1,18
8	1,26	22	1,18
9	1,26	23	1,17
10	1,25	24	1,17
11	1,24	25	1,16
12	1,24	26	1,15
13	1,23	27	1,15
14	1,23	28	1,14
15	1,22	29	1,14
16	1,21	30	1,13
17	1,21	31	1,13

1 ccm der zu prüfenden Lösung nach der gegebenen Vorschrift mit eisen- und orcinhaltiger Salzsäure erhitzen, mit dem entsprechenden, genau bekannten Volumen Amylalkohol ausschütteln, den Extinktionskoeffizienten bestimmen, das Produkt $v \, . \, \varepsilon$ noch um den Faktor f aus der am Ende des Textes wiedergegebenen Tabelle V korrigieren und einfach aus Tabelle IV die dem Werte $v \, . \, f \, . \, \varepsilon$ entsprechende gesuchte Glucuronsäurekonzentration ablesen. Zur Berechnung des korrigierten Volumens des Amylalkohols $v \, . \, f$ dient die bereits erwähnte und aus meiner früheren Mitteilung übernommene Tabelle V.

Diese Arbeit wurde auf Anregung und unter Leitung des Herrn Prof. *P. Hári* mit Hilfe der von der *Ella Sachs-Plotz*-Stiftung zugewendeten Mittel ausgeführt; ihrer Verwaltung sei unser bester Dank quittiert.

Deutung und Folgen der Veränderung in der Körperzusammensetzung kleiner, an Hunger oder Unterernährung verendeter Tiere.

Von

Emerich Szörényi.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut der königl. ung. Universität Budapest.)

(Eingegangen am 24. Januar 1927.)

Es ist längst bekannt, daß der auf die Einheit des Körpergewichts oder der Körperoberfläche reduzierte Energieumsatz an manchen Individuen wesentlich andere Werte aufweist als an den meisten anderen Individuen derselben Tierart. So fällt z. B. der derart berechnete Wert erheblich geringer an solchen Tieren aus, in denen vorangehend größere Mengen Fett angesetzt wurden; denn auf diese Weise wird zwar das Körpergewicht erhöht, die Umsätze nehmen aber nicht in solchem Maße zu, da sich an ihnen das Fettgewebe in weit geringerem Grade als der Eiweißbestand beteiligt. Das Umgekehrte kann an sehr fettarmen, besonders muskulösen Individuen der Fall sein.

Auch ist es wiederholt beschrieben worden, daß im protrahierten Hungerzustande oder bei chronischer Unterernährung der reduzierte Energieumsatz zuweilen ganz erheblich abnimmt, und wurde für diese Fälle eine absolute und, was eigentlich ausschlaggebend ist, auch eine relative Verringerung des Eiweißbestandes teils angenommen, teils auch bewiesen.

Zu einer anderen Kategorie gehören die Fälle, in denen ein und dasselbe Tier zu verschiedenen Zeiten einen verschieden großen reduzierten Energieumsatz aufweist, dabei aber sein Körpergewicht ein annähernd konstantes ist, so daß man keine Veranlassung hat, eine Änderung seiner Körperzusammensetzung im obigen Sinne anzunehmen. So fand *Graham-Lusk*[1]), daß der reduzierte Energieumsatz eines seiner Versuchshunde, wenn das Tier nach einem längeren Aufent-

[1]) *Graham Lusk*, Journ. of biol. Chem. **20**, 565, 1915.

halt am Lande, wo es sich in Freiheit bewegen konnte, nach dem Institut in der Stadt zurückgebracht und bald darauf kalorimetrisch geprüft wurde, wesentlich größer war als nachdem das Tier wieder längere Zeit hindurch in den Institutsräumen gehalten ward. (Ob hierbei physiologische oder psychische Momente im Spiele sind, mag hier unerörtert bleiben.)

Weit schwerer zu deuten sind die oft recht erheblichen Schwankungen des reduzierten Energieumsatzes, die man in längeren Serienbestimmungen erhält, namentlich, wenn man zu diesen Versuchen gefütterte, jedoch immer im Nüchternzustande untersuchte kleinere Versuchstiere (Ratten, Mäuse) verwendet, die erfahrungsgemäß auch relativ ungemein große Schwankungen ihres Körpergewichts nach beiden Richtungen hin aufweisen. Die Schwankungen des reduzierten Energieumsatzes können so groß sein, daß man oft Mühe hat, auf Grund der voneinander erheblich abweichenden Werte den Grundumsatz zu ermitteln.

Hat das Körpergewicht eines solchen Tieres eine Zunahme erfahren, so läßt sich die Verringerung des reduzierten Energieumsatzes sehr leicht im obigen Sinne aus dem Fettansatz erklären. Ist aber die Zunahme des Körpergewichts mit einer Vergrößerung des reduzierten Energieumsatzes verbunden, so müßte angenommen werden, daß nur der Eiweißbestand des Tieres eine Vermehrung, und zwar nicht nur eine relative, erfahren hat. Daß an erwachsenen Tieren Eiweißansatz nur ausnahmsweise vorkommt, ist längst bekannt; doch sind die diesbezüglichen Erfahrungen an größeren Versuchstieren gewonnen und ist es ganz gut möglich, daß kleine Versuchstiere, wie z. B. Mäuse, sich anders verhalten. Es ist aber auch möglich, daß der reduzierte Energieumsatz auch bei unverändertem Körpergewicht Änderungen nach beiden Richtungen hin erfährt, und zwar dadurch, daß Einschmelzung von Körpereiweiß mit gleichzeitigem Fettansatz, oder umgekehrt Fettschwund mit gleichzeitigem Eiweißansatz vergesellschaftet ist.

Solche Fragen können natürlich nicht anders als auf experimentellem Wege gelöst werden: man müßte am selben Tiere vor und nach einer bestimmten Fütterungsart einerseits kalorimetrische Bestimmungen ausführen, andererseits jedesmal, also zu wiederholten Malen auch die Körperzusammensetzung bestimmen, was ja natürlich ein Ding der Unmöglichkeit ist.

Das Problem ist ein sehr verwickeltes und besteht aus einer Anzahl von Teilproblemen. In nachstehender Arbeit habe ich eines dieser Teilprobleme zu lösen und namentlich zu ermitteln versucht, wie *sich am hungernden und am unterernährten Tiere das Verhältnis zwischen Wasser-, Eiweiß- und Fettgehalt gestaltet?*

A. Versuchseinrichtung.

Zu den Versuchen wurden erwachsene weiße Mäuse gruppenweise verschiedenartig ernährt und zu einem geeigneten Zeitpunkte der Analyse zugeführt. An einer ersten Gruppe von Tieren wurde die Menge der vorgelegten Nahrung so lange geändert, bis sich das Körpergewicht nicht mehr änderte; sobald dieser Gleichgewichtszustand eine Zeitlang bestanden hatte, wurden die Tierkörper analysiert. An einer zweiten Gruppe wurde die Nahrung und (mit Ausnahme der Mäuse 2 und 5) auch das Trinkwasser entzogen, und wurden die Tiere analysiert, sobald sie dem Hungertode voraussichtlich bald erlegen wären. An einer dritten Gruppe wurde die Nahrung, bestehend in Hafer oder in Weißgebäck, das zuvor in Wasser eingelegt war, soweit beschränkt, daß die Tiere von Tag zu Tag an Körpergewicht abnahmen und infolge der ungenügenden Ernährung zugrunde gegangen wären. Kurz vor dem zu gewärtigenden Tode wurden die Tiere der Analyse zugeführt.

B. Methodik der Versuche.

Das zu analysierende Tier wurde durch Abknickung der Wirbelsäule im obersten Cervicalabschnitt und dadurch bewirkte Zerstörung des Halsmarkes fast augenblicklich getötet und der Kadaver gewogen. Da die großen und wechselnden Stickstoffmengen der Epidermis und der Haare die Verhältnisse in unberechenbarer Weise kompliziert hätten, wurde dem Kadaver nach der Abwage die Haut abgezogen, was bis nahe an das distale Ende der Extremitäten leicht durchzuführen war; dort war eine glatte Loslösung der Haut nicht möglich, so daß die äußersten Enden der Extremitäten mit einem Scherenschlag abgeschnitten und zur abgezogenen Haut geschlagen werden mußten. Gleich darauf wurde die Bauchhöhle geöffnet, der Inhalt der Därme mit einer Pinzette herausgestreift, auch der Inhalt des aufgeschnittenen Magens entfernt, und der abgehäutete Kadaver (mitsamt dem leeren Darm und Magen) gewogen. Auf diese Weise ergab sich ein Gewichtsunterschied, der zum größten Anteil durch den nunmehr fehlenden Magen- und Darminhalt, zu einem kleineren Anteil durch Wasserverdampfung während der allerdings kaum mehr als 5 Minuten dauernden Manipulationen und zum geringsten Anteile durch Blut verursacht wurde, das an den Instrumenten haften blieb. Der Gesamtverlust betrug in der Mehrzahl der Fälle etwa $\frac{1}{2}$ g, zuweilen weniger, zuweilen mehr. Den von Haut, Magen- und Darminhalt befreiten Tierkörper, der außerdem noch die soeben erwähnten Verluste erlitten hat, wollen wir der Kürze halber als „*abgehäutetes Volltier*“ bezeichnen; an diesem wurden die Bestimmungen ausgeführt, und die Ergebnisse teilweise auch auf das „*fettfrei gedachte Tier*“ umgerechnet.

Das abgehäutete Volltier wurde mittels einer Schere grob zerkleinert, an der Schere haftengebliebene Teile mit der Hauptmasse vereinigt, diese auf einem Uhrglase im Wasserdampf-Thermostaten bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und so der „*Trockensubstanzgehalt*“ ermittelt. Die Trockensubstanz wurde im Wägezimmer so lange frei an der Luft stehengelassen, bis keine weitere Gewichtszunahme mehr erfolgte, gewogen und die auf diese Weise erhaltene „*lufttrockene Substanz*“ in einem Messingmörser zu einem möglichst gleichmäßigen, feinen Pulver verrieben. Dieses diente zu den eigentlichen Analysen. An fettarmen Tieren gelang die Pulverisierung ohne weiteres, an fettreichen mußte erst am grob zerkleinerten Tierkörper

das Fett durch Extraktion entfernt werden. Die entfettete Masse war gut pulverisierbar und wurde dann weiter verarbeitet. In aliquoten Anteilen des Pulvers wurde in Parallelanalysen der Fettgehalt durch 48stündiges Extrahieren mit Äther, der N-Gehalt aber nach *Kjeldahl* bestimmt, und aus dem N-Gehalt der Eiweißgehalt des Tierkörpers unter Vernachlässigung sonstiger N-haltiger Bestandteile in der Annahme berechnet, daß dem Gesamteiweiß ein N-Gehalt von 16 Proz. zukomme. Bei der Bestimmung des Aschengehalts habe ich nach der bekannten Vorschrift die zu analysierende Substanz erst bei gelinder Rotglut verkohlt, aus der Kohle die löslichen Salze mit heißem Wasser extrahiert, und nun erst den Rückstand, der keine bei höherer Temperatur flüchtigen Salze mehr enthielt, geglüht. Zu dem Glührückstand wurde die durch Extraktion gewonnene Salzlösung hinzugefügt, eingedampft und der Rückstand bei schwacher Rotglut kurz erhitzt. Es muß aber bemerkt werden, daß an Maus 6, 19, 13 und 1 nur je eine Aschenbestimmung ausgeführt werden konnte, und an Maus 16, 5 und 17 die Parallelanalysen nicht gut übereingestimmt haben. Die bei den anderen Tieren angegebenen Daten stellen Mittelwerte aus gut übereinstimmenden Doppelanalysen dar.

C. Die Versuchsdaten.

Die auf die normal ernährten, hungernden und unterernährten Tiere bezüglichen Daten sind in den Tabellen I, II und III zusammengestellt. Tabelle I enthält die allgemeinen Daten, Tabelle II die Analysenergebnisse, die sich auf das gesamte abgehäutete Volltier beziehen, in Tabelle III sind diese Werte auf den fettfrei gedachten Tierkörper umgerechnet.

Dabei ist aber noch folgendes zu bemerken. Im Wasser- bzw. Trockensubstanzgehalt war an fünf von den sechs normal ernährten Tieren kein größerer Unterschied vorhanden, wohl aber am äußerst fettreichen Tiere 10, das aus diesem Grunde von der Berechnung der mittleren Zusammensetzung des abgehäuteten Volltieres ausgeschlossen werden mußte, aber mitberücksichtigt wurde bei der Umrechnung auf den fettfrei gedachten Tierkörper. Ferner darf auch nicht vergessen werden, daß die Abhäutung so manche Fehler involviert, da sich die nicht mitanalysierte Haut am hungernden und am unterernährten Tiere möglicherweise anders als der übrige Tierkörper ändert. Ein solcher, wenn auch wahrscheinlich sehr geringer Fehler entsteht sicherlich dadurch, daß die Haargebilde auch während des Hungerns bzw. der Unterernährung weiter wachsen, was einem N-Ansatz gleichkommt und dadurch ein N-Defizit bei der Analyse des übrigen Tierkörpers verursacht.

Daß trotz alledem die Bestimmung der einzelnen Körperbestandteile an die Grenze der Genauigkeit heranreichte, die bei Wasser-, Eiweiß-, Fett- und Aschenbestimmung an einer so wenig homogenen Substanz, wie der zerkleinerten Tierkörper, überhaupt möglich ist, geht aus dem letzten Stabe der Tabelle II hervor, die zeigt, daß im

Mittelwert je einer Gruppe von Tieren 98,5 bzw. 98,8 bzw. 97,8 Proz. der gesamten analysierten Masse zurückerhalten wurden, wobei in den fehlenden 1,2 bis 2,2 Proz. auch das Glykogen enthalten ist, das nicht gesondert bestimmt wurde.

D. Ergebnisse der Versuche.

Der Einfluß des totalen Hungerns und der ungenügenden Ernährung auf die prozentuale Zusammensetzung des Tierkörpers läßt sich ermitteln, wenn man die an diesen Tieren erhaltenen Mittelwerte, die für die einzelnen Körperbestandteile (Wasser, Trockensubstanz, Eiweiß, Fett) berechnet sind, mit den entsprechenden Daten der normal ernährten Tiere vergleicht.

a) Bezüglich der *Volltiere* ergab sich folgendes:

Fettgehalt. In der prozentualen Zusammensetzung der Tiere ist am auffallendsten die *Abnahme des Fettgehalts* auf etwa den dritten Teil des ursprünglichen Wertes im hungernden Tiere, auf einen noch geringeren Wert im unterernährten Tiere. Es ist dies eine so lange und allgemein bekannte Tatsache, daß hieran keinerlei weitere Erörterungen geknüpft werden müssen. (Anders verhält es sich bezüglich der Frage, ob das Überwiegen des verbrannten Fettes auch dann zum Ausdruck kommt, wenn man nicht dessen prozentuale, sondern absolute Menge vergleicht. Hierüber siehe Näheres weiter unten.)

Wassergehalt. Der prozentuale Wassergehalt der hungernden und ungenügend ernährten Tiere ist konstanter als der des normal ernährten; dort schwanken die Werte zwischen 70,9 und 72,9 bzw. 72,8 und 74,9 Proz., hier aber zwischen 58,7 und 71,3 Proz.; bzw. wenn man vom besonders fettreichen Tiere 10 absieht, zwischen 66,6 und 71,3 Proz. Daß dies mit dem stärker als an hungernden und schlecht ernährten Tieren wechselnden Fettgehalt der normal ernährten zusammenhängt, geht z. B. auch aus den Angaben von *Magnus-Levy*[1]) hervor, der an einem fetten Schafe 35 Proz., an einem weniger fetten aber 57 Proz. Wasser fand.

Vergleicht man die mittleren Werte in Tabelle II, so ergibt sich folgendes: ***im Hungerzustande ist der Wassergehalt deutlich, im Zustande der Unterernährung noch stärker erhöht*** (die Trockensubstanz entsprechend herabgesetzt). Dieser Befund stimmt gut mit einigen aus der Literatur bekannten Daten überein, so zunächst mit den Angaben von *Tachau*[2]), der an nicht hungernden Mäusen einen Wassergehalt von 61 bis 74 Proz.

---

[1]) Noordens Handb. d. Pathol. des Stoffwechsels **1**, 445.

[2]) *Tachau*, Wasserverteilung u. Ödembildung bei Salzzufuhr, diese Zeitschr. **67**, 338, 1914.

Tabelle I.

Tier Nr.	Datum des Versuchs	Körpergewicht des Tieres: beim Einstellen zum Versuch g	Körpergewicht des Tieres: knapp nach dem Töten g	Abnahme des Körpergewichts: in g	Abnahme des Körpergewichts: in Proz.	Haut und Extremitätenenden g	Sonstige Verluste g	Zur Analyse kamen g	
3	Oktbr. 1925	—	22,2	—	—	4,4	0,3	17,52	Körpergewicht konstant seit ?
6	Novbr.	—	16,6	—	—	3,0	1,1	12,54	3 Tagen
10	Febr. 1926	—	20,4	—	—	3,7	0,7	15,97	3 „
15	April	—	16,2	—	—	3,0	0,5	12,65	6 „
16	„	—	16,2	—	—	3,6	0,5	12,10	7 „
19	Mai	—	15,3	—	—	3,4	0,6	11,36	3½ „
2	Oktbr. 1925	20,3	14,8	5,5	27,1	3,0	0,3	11,51	68 Stunden gehungert
5	Novbr.	19,1	15,0	4,1	21,5	2,8	0,6	11,65	62 „ „
12	März 1926	18,9	13,3	5,5	29,4	2,5	0,5	10,31	4 Tage gehungert
13	April	20,9	11,8	9,1	43,6	2,2	0,3	9.21	4 „ „
14	„	21,5	12,0	9,4	43,9	2,3	0,6	9,12	4½ „ „
17	Mai	16,0	10,2	5,8	36,2	1,8	0,5	7,90	3 „ „
20	Juni	22,9	15,8	7,1	31,1	3,2	0,4	12,21	3 „ „
1	Septbr. 1925	?	13.4	—	—	2,0	0,5	10,87	krank, schlecht ernährt
4	Novbr.	24,6	17,8	6,8	27,6	3,3	0,6	13,87	10 Tage ungenügend ernährt
7	Januar 1926	22,6	13,9	8,7	38,3	2,2	0,8	10.95	14 „ „ „
9	März	22,8	12,0	10,8	47,2	1,9	0,6	9.54	20 „ „ „
18	Mai	17,4	11,3	6,1	35,1	2,1	0,5	8.64	7 „ „ „

Tabelle II.

Zusammensetzung des abgehäuteten Volltiers.

Tier Nr.	Wasser		Trocken-substanz		Eiweiß		Fett		Asche		Von der analysierten Substanz wieder-gefunden
	g	Proz.	g	Proz.	g	Proz.	g	Proz.	g	Proz.	Proz.
3	12,27	70,0	5,25	30,0	3,09	17,6	1,33	7,6	0,68	3,9	99,1
6	8,70	69,4	3,84	30,6	2,19	17,4	1,09	8,7	0,34	2,7	98,2
10	9,37	58,7	6,60	41,3	2,26	13,8	3,50	21,9	0,52	3,3	97,6
15	8,42	66,6	4,23	33,4	1,88	14,9	1,36	10,7	0,77	6,1	98,3
16	8,27	68,4	3,82	31,6	2,03	16,8	1,10	9,1	0,72	5,9	100,3
19	8,10	71,3	3,26	28,7	1,81	16,1	0,68	6,0	0,46	4,0	97,4
Mittelwerte ohne Tier 10:		**69,1**		**30,9**		**16,6**		**8,4**		**4,5**	**98,5**
2	8,20	71,2	3,31	28,7	2,24	19,5	0,36	3,1	0,58	5,1	98,9
5	8,45	72,5	3,21	27,5	2,38	20,4	0,30	2,6	0,55	4,7	100,2
12	7,59	72,8	2,81	27,2	1,96	19,0	0,30	2,9	0,42	4,1	98,9
13	6,54	71,1	2,66	28,9	1,72	18,7	0,25	2,7	0,49	5,3	97,8
14	6,47	70,9	2,65	29,1	1,77	19,4	0,25	2,7	0,53	5,8	98,9
17	5,76	72,9	2,14	27,1	1,30	16,5	0,25	3,1	0,41	5,2	97,7
20	8,82	72,2	3,40	27,8	2,39	19,6	0,30	2,5	0,64	5,2	99,5
Mittelwerte:		**71,9**		**28,1**		**19,0**		**2,8**		**5,1**	**98,8**
1	7,98	73,5	2,89	26,5	1,82	16,6	0,32	2,9	0,47	4,3	97,3
4	10,24	73,8	3,63	26,2	2,48	17,9	0,30	2,1	0,63	4,5	98,4
7	8,21	74,9	2,74	25,1	1,60	14,6	0,24	2,2	0,54	4,9	96,7
9	6,95	72,8	2,59	27,2	1,59	16,6	0,24	2,5	0,49	5,2	97,1
18	6,40	74,1	2,24	25,9	1,53	17,7	0,22	2,5	0,46	5,3	99,7
Mittelwerte:		**73,8**		**26,2**		**16,7**		**2,4**		**4,8**	**97,8**

fand, während die betreffenden Werte bei mir 59 bis 71 Proz. betragen. An hungernden Tauben fand *Lukjanow*[1]) den Wassergehalt in Oberschenkelmuskeln und Knochen erhöht, in einer Reihe anderer Organe unverändert, in Pankreas und Leber herabgesetzt; *Voit*[2]) in Knochen eines verhungerten Hundes, *Sedlmair*[3]) in Knochen hungernder Katzen erhöht, *Moulton*[4]) in Rindermuskeln unverändert, in der Leber etwas erhöht, *Junkersdorf*[5]) in kurzdauernden Hungerversuchen am Hunde in der Leber etwas herabgesetzt, *Biddle* und *Howe*[6]) ebenfalls an Hunden

[1]) *Lukjanow*, Zeitschr. f. phys. Chem. **13**, 339, 1888.

[2]) *Voit*, Gewichte der Organe eines wohlgenährten und eines hungernden Hundes, Zeitschr. f. Biol. **30**, 510, 1894.

[3]) *Sedlmair*, Über die Abnahme der Organe insbesondere der Knochen beim Hunger. Ebendaselbst **37**.

[4]) *Moulton*, Biochem. changes in the flesh of beef animals during underfeeding. Journ. of biol. Chem. **43**.

[5]) *Junkersdorf*, Beiträge zur Physiologie der Leber. I. Mitt. Pflügers Arch. **186**, 238, 1920.

[6]) *Biddle* und *Howe*, Biochem. Bull. **2**, 386 bis 389.

in den Muskeln etwas erhöht. *Zuntz*[1]) fand das Knochenmark unterernährter Kälber „ganz ungewöhnlich“ wasserreich.

Eiweißgehalt. Der prozentuale *Eiweißgehalt der hungernden Tiere war erheblich erhöht.* Die Zunahme betrug etwa 15 Proz. und wird erst weiter unten ihre Erklärung finden. Bei ungenügender Ernährung nimmt der prozentuale Eiweißgehalt weniger stark zu.

Wenn auch am normalen wie auch am hungernden und unterernährten Tiere Werte vorkommen, die stark aus der Reihe springen, und in obigen Mittelwerten naturgemäß alle unvermeidlichen Analysenfehler sich summieren, können obige Ergebnisse als genügend sichergestellt angesehen werden; um so mehr, da an den Volltieren die Resultante aus dem abnehmenden Fett- und dem zunehmenden Eiweißgehalt mit der Änderung des Trockensubstanzgehalts, wie aus nachstehender Zusammenstellung hervorgeht, gut übereinstimmt, zumal, wenn man in Betracht zieht, daß sicherlich auch das Glykogen eine Einbuße erlitten haben muß.

	Wasser Proz.	Trockensubstanz Proz.	Eiweiß Proz.	Fett Proz.
Hunger	+ 2,81	— 2,81	+ 2,44	— 5,62
Unterernährung . . .	+ 4,69	— 4,69	+ 0,12	— 5,97

b) In dem fettfrei gedachten Tierkörper verhält sich die Sache etwas anders. Wie den Daten der nachstehenden Tabelle III zu entnehmen ist, sind die durch Hunger bzw. ungenügende Ernährung verursachten Änderungen in der Zusammensetzung des fettfrei gedachten Tierkörpers geringer als im Volltier. Auch ist ein gewisser Gegensatz zwischen hungernden und ungenügend ernährten Tieren zu konstatieren: der Wassergehalt ist am Hungertier etwas herabgesetzt, am unternährten unverändert; der Eiweißgehalt am Hungertier deutlich erhöht, am unterernährten ein wenig herabgesetzt. Diesen Befunden, namentlich dem Gegensatze zwischen beiden Gruppen, möchte ich aber angesichts der meist bloß recht geringen Ausschläge keine besondere Bedeutung zumessen, um so weniger, als ja in den genannten Werten die unvermeidlichen, wenn auch nicht zu großen Fehler der Fettbestimmung zum Ausdruck kommen. Auch die Befunde früherer Autoren weisen diesbezügliche Widersprüche auf, indem nach *Schultz*[2]) der N- bzw. Eiweißgehalt in der fettfrei gedachten Trockensubstanz unverändert, nach *Biddle* und *Howe*[3]) aber erhöht ist.

[1]) *Zuntz*, Noordens Handb. d. Pathol. d. Stoffwechsels **1**, 446.

[2]) *Schultz*, Über d. Verteilung von Fett u. Eiweiß bei magerem Tier usw. Arch. f. d. ges. Phys. **66**, 145, 1897.

[3]) l. c.

Tabelle III.

Zusammensetzung des abgehäuteten und fettfrei gedachten Tierkörpers.

Tier Nr.	Wasser Proz.	Trockensubstanz Proz.	Eiweiß Proz.
3	75,8	24,2	19,1
6	76,0	24,0	19,1
10	75,2	24,8	17,6
15	74,6	25,4	16,7
16	75,3	24,7	18,5
19	75,9	24,1	17,1
Mittelwerte:	**75,5**	**24,5**	**18,0**
2	73,4	26,6	20,1
5	74,4	25,6	20,9
12	75,0	25,0	19,6
13	73,1	26,9	20,5
14	72,9	27,1	19,9
17	75,3	24,7	17,0
20	74,0	25,9	20,1
Mittelwerte:	**74,0**	**26,0**	**19,7**
1	75,6	24,4	17,2
4	75,5	24,5	18,3
7	76,6	23,4	14,5
9	74,7	25,3	17,0
18	76,0	24,0	18,2
Mittelwerte:	**75,7**	**24,4**	**17,1**

E. Deutung der prozentualen Änderung in der Zusammensetzung des Tierkörpers.

Die bedeutende Zunahme des relativen Wassergehalts im hungernden und im unterernährten Tiere ist eine feststehende Tatsache und es fragt sich, ob hieraus auf eine *Verwässerung* des Tierkörpers geschlossen werden darf, entstanden durch *Retention von Verbrennungswasser* an den Hungertieren, von *getrunkenem Wasser* an den unterernährten? Daß dies *nicht* der Fall ist, geht aus der ebenfalls feststehenden Tatsache hervor, daß auch der relative Eiweißgehalt am Hungertiere eine bedeutende (am unterernährten Tiere keine) Zunahme erfährt. Gehen wir von der allerdings etwas übertriebenen Annahme aus, daß im Tiere das Wasser nur als Lösungsmittel für das Körpereiweiß vorhanden ist, so ergibt sich, daß der Tierkörper normalerweise in 69,1 g Wasser plus 16,6 g Eiweiß 80,6 Proz. Wasser, im Hungerzustande in 72,0 g Wasser plus 19,0 g Eiweiß 79,1 Proz. Wasser, bei Unterernährung in 73,8 g Wasser plus 16,7 g Eiweiß 81,5 Proz. Wasser enthält, mit anderen Worten, daß *das Hungertier als eine Eiweißlösung gedacht ein wenig verdünnter, das unterernährte ein wenig konzentrierter ist als das normal ernährte Tier*; bzw. wenn man die geringen Unterschiede zwischen hungernden und unterernährten Tieren als von Versuchs-

fehlern herrührend betrachtet und von beiden Gruppenmittelwerten einen neuen Mittelwert bildet, *die hungernden und unterernährten Tiere, als wässerige Eiweißlösung gedacht, sich von normal ernährten nicht unterscheiden.* Das ist auch ganz plausibel, wenn man bedenkt, daß — wieder im Sinne obiger Annahme — beim Einschmelzen von Gewebseiweiß stets auch proportionale Mengen von Wasser aus dem Verbande gelöst und ausgeschieden werden; wird aber neben Eiweiß und Wasser auch ein solcher Körperbestandteil eingeschmolzen, der, wie das Fett, wenig oder gar keinen Bezug auf das Körperwasser hat, *so muß dies notwendigerweise zu einer relativen Zunahme nicht nur des relativen Eiweißgehalts, sondern auch zu der des relativen Wassergehalts* führen.

Hiermit im Zusammenhang ist aber auch eine der eingangs aufgeworfenen Fragen beantwortet, ob nämlich — als Gegenstück zur Abnahme des auf die Körpergewichtseinheit reduzierten Energieumsatzes infolge Fettansatzes bzw. einer Zunahme des Energieumsatzes infolge Eiweiß- (Muskel-) Ansatzes — eine Abnahme oder eine Zunahme des reduzierten Energieumsatzes auch bei *abnehmendem Körpergewicht,* wo also weder Fett noch Eiweiß angesetzt wird, sondern im Gegenteil verloren geht, möglich ist? Die Frage muß *nach beiden Richtungen bejahend beantwortet werden.* Ist nämlich verhältnismäßig mehr Fett als Eiweiß verloren gegangen, so wird *der relative Eiweißgehalt* trotz der gleichzeitigen Zunahme des relativen Wassergehalts *so stark erhöht, daß der auf die Körpergewichtseinheit reduzierte Energieumsatz eine Erhöhung erfährt.* Ist hingegen der Organismus dadurch eiweißärmer geworden, daß mehr Eiweiß als Fett verbrannt wurde, so muß es, da in dem verhältnismäßig *fettreicher gewordenen Tierkörper* die Umsätze stärker abgenommen haben als das Körpergewicht, zu einer *Herabsetzung des reduzierten Energieumsatzes kommen,* die nur teilweise dadurch kompensiert ist, daß neben dem erhöhten Eiweißverlust auch ein stärkerer Wasserverlust eingetreten ist, durch den das Körpergewicht weiter abgenommen hat.

F. Folgen des absoluten Eiweiß- und Fettverlustes.

Es ist eine landläufige Ausdrucksweise, wenn man sagt, daß sich das *Hungertier überwiegend auf Kosten seines Fettbestandes erhält.* Sie basiert auf der unbestreitbaren Tatsache, daß im Körper eines verhungerten Tieres meist über 90 Proz. des vormaligen Fettes und nur etwa die größere Hälfte des vormaligen Eiweißbestandes fehlen. Es soll nun gezeigt werden, daß obige Tatsache zwar selbstverständlicherweise zu Recht besteht, *jene Ausdrucksweise* aber für viele Fälle *nicht richtig ist.* In nachstehender Tabelle IV habe ich den in Grammen ausgedrückten Eiweiß- und Fettverlust meiner hungernden und unter-

Tabelle IV.

Tier Nr.	Eiweiß			Fett			
	vorher g	nachher g	Verlust g	vorher g	nachher g	Verlust g	
2	2,82	2,24	0,58	1,43	0,36	1,07	68 Stunden gehungert
5	2,61	2,38	0,23	1,33	0,30	1,03	62 „ „
12	2,63	1,96	0,67	1,34	0,30	1,04	4 Tage gehungert
13	3,03	1,72	1,31	1,54	0,25	1,29	4 „ „
14	3,08	1,77	1,31	1,56	0,25	1,31	4½ „ „
17	2,27	1,30	0,97	1,15	0,25	0,90	3 „ „
20	3,20	2,39	0,81	1,63	0,30	1,33	3 „ „
4	3,42	2,48	0,94	1,74	0,30	1,44	10 Tage unterernährt
7	3,25	1,60	1,65	1,65	0,24	1,41	14 „ „
9	3,36	1,59	1,77	1,71	0,24	1,47	20 „ „
18	2,44	1,53	0,91	1,24	0,22	1,02	7 „ „

ernährten Tiere berechnet und dieser Berechnung den an den normal ernährten Tieren erhaltenen Mittelwert zugrunde gelegt. Dies ist wohl anfechtbar, doch läßt sich die Berechnung auf keine andere Weise durchführen, und können die Fehler, die auf diese Weise entstehen, das Ergebnis seinem Wesen nach nicht ändern. Im zweiten Stabe der Tabelle I ist bei jedem Tiere das Körpergewicht zu Beginn des Hungerns bzw. der Unterernährung angegeben. Von diesem Gewicht habe ich, da auch später nicht das ganze Tier analysiert wurde, die Verluste abgezogen, die der Tierkörper anläßlich der Aufarbeitung durch Abhäutung, Entleerung des Magens und Darmes usw. (Stab 6 und 7 der Tabelle I) erlitten hat, und nun auf Grund der in Tabelle II für den normal ernährten Tierkörper angegebenen Mittelwerte den Eiweiß- und Fettgehalt des um obigen Verlust verringerten Tierkörpers zu *Beginn* des Hungerns bzw. der Unterernährung berechnet. Der in Gramm ausgedrückte Eiweiß- und Fettgehalt am Ende des Hungerns bzw. der Unterernährung ist in Tabelle IV angegeben und konnte nun durch Subtraktion der letzteren Werte von obigen der *Eiweiß- und Fettverlust* erhalten werden. Ein Blick auf die im vierten und siebenten Stabe der Tabelle IV befindlichen Daten zeigt, daß bloß *in der Hälfte aller hungernden und unterernährten Mäuse mehr Fett als Eiweiß verloren ging, in der anderen Hälfte aber umgekehrt mehr Eiweiß als Fett verbrannt wurde.* Ordnet man aber die betreffenden Daten nach der Dauer des Hungerns bzw. der Unterernährung, so ergibt sich, wie aus nachstehender Tabelle V hervorgeht, daß die Fettverbrennung in denjenigen Fällen überwiegt, in denen der Hunger bzw. die Unterernährung bloß kürzer andauerte, hingegen der *Eiweißverlust dem Fettverlust gleichkommt oder ihn gar überflügelt, wenn das Tier länger hungerte* bzw. längere Zeit hindurch unterernährt wurde, was übrigens auch schon vielfach beschrieben wurde. Worauf ich aber hinweisen

Tabelle V.

Tier Nr.	Dauer	Hunger: Eiweißverlust g	Hunger: Fettverlust g	Tier Nr.	Dauer	Unterernährung: Eiweißverlust g	Unterernährung: Fettverlust g
5	62 Stdn.	0,23	1,03	18	7 Tage	0,91	1,02
2	68 „	0,58	1,07	4	10 „	0,94	1,44
20	3 Tage	0,81	1,33	7	14 „	1.65	1,41
17	3 „	0,97	0,90	9	20 „	1,77	1,47
12	4 „	0,67	1,04				
13	4 „	1,31	1,29				
14	$4^1/_2$ „	1,31	1,31				

will, ist, daß z. B. an den Tieren 13 und 14, die jeweils gleiche Mengen von Eiweiß und Fett verbraucht hatten, diese gleichen Verluste zu einer quantitativ gänzlich verschiedenen Änderung des Eiweiß- und Fettbestands geführt hatten. Denn es betrug am

Tier 13: der Eiweißbestand . . . . 3,03 g
„ Eiweißverlust . . . . 1,31 g
„ Fettbestand . . . . 1,54 g
„ Fettverlust . . . . 1,29 g
Tier 14: der Eiweißbestand . . . . 3,07 g
„ Eiweißverlust . . . . 1,31 g
„ Fettbestand . . . . 1,56 g
„ Fettverlust . . . . 1,31 g

und der gleiche Verlust an Eiweiß und Fett führte am

Tier 13: zu einem Eiweißrest von . . . . . 1,72 g
„ „ Fettrest von . . . . 0,25 g
Tier 14: zu einem Eiweißrest von . . . . 1,76 g
„ „ Fettrest von . . . . 0,25 g

Wenn also die *verhungerten Tiere nur den sechsten Teil ihres ursprünglichen Fettvorrats, hingegen weit mehr als die Hälfte ihres Eiweißbestands behalten hatten, rührt dies nicht davon her, daß die hungernden Tiere überwiegend auf Kosten ihres Fettbestands gelebt hatten, sondern einfach davon, daß Eiweiß- und Fettverbrauch gleich groß waren, der ursprüngliche Eiweißbestand aber doppelt so groß gewesen ist als der ursprüngliche Fettbestand.*

Diese Arbeit wurde auf Anregung und unter Leitung des Herrn Prof. *Hári* ausgeführt.

Über das Hautskelett von Insekten.
Über Dioxyphenylalanin in den Flügeldecken von Maikäfern.

Von

Hans Schmalfuss und Hans-Paul Müller.

(Aus dem chemischen Staatsinstitut Hamburg, Universität.)

(Eingegangen am 24. Januar 1927.)

In einer früheren Arbeit[1]) wurde gezeigt, wie vererbungstheoretisch ermittelte Rassenunterschiede in der Pigmentierung chemisch zwanglos erklärt werden können. Hierzu war es nötig, gewisse o-Dioxybenzolderivate als Chromogene anzunehmen. In einer besonderen Untersuchung[2]) wurde nachgewiesen, daß wirklich ein o-Dioxybenzolderivat im Hautskelett von Insekten vorkommt. Unter den o-Dioxybenzolderivaten besitzt nun für die Erklärung der Rassenunterschiede das l-β-3, 4-Dioxyphenyl-α-alanin (= D) eine ganz besondere Bedeutung. Denn einerseits bildet das D besonders leicht und schnell ein tief dunkles Pigment, andererseits vermag schon ein so geringer Unterschied der Wasserstoffionenaktivität, wie wir ihn an verschiedenen Orten eines tierischen Organismus erwarten dürfen, den Grad der fermentativen Pigmentbildung aus D stark zu beeinflussen.

Deshalb ist es für die Vererbungswissenschaft, die Zoologie und die Medizin gleich wichtig zu wissen, ob wirklich das D im tierischen Organismus vorkommt. Denn eine ganze Reihe moderner Arbeiten würde dadurch ihre materielle Grundlage erhalten.

Wir erwähnen nur die schönen Untersuchungen *K. Hasebroeks*[3]) „Über den neuzeitlichen Melanismus der Schmetterlinge", ferner *H. Przibrams*[4]) und seiner Mitarbeiter „Über die Ursachen tierischer Farbkleidung". Denn weder in Schmetterlingen noch in anderen wirbellosen Tieren ist unseres Wissens bisher irgend ein Chromogen der melaninartigen Pigmente durch Analyse und Konstitutionsbestimmung sicher nachgewiesen worden.

---

[1]) *Hans Schmalfuss* und *Hans Werner*, Zeitschr. f. induktive Abstammungs- und Vererbungslehre **41**, 285 bis 358, 1926.

[2]) *Dieselben*, Über das Hautskelett von Insekten. Ber. **58**, 2763, 1925.

[3]) Fermentforschung **8**, 568, 1926.

[4]) Arch. f. Entw.-mech. d. Organismen **48**, 140, 1921.

Für eine solche Untersuchung hielten wir die Maikäferarten [Melolontha melolontha L. und hippocastani F.[1])] für besonders geeignet, weil sie sich leicht in größeren Mengen beschaffen lassen und als allgemein bekannte Tiere vielfach untersucht sind. Über das Chromogen von Maikäferpigment ist früher noch nicht gearbeitet worden. Auch über das Pigment selbst ist nur wenig bekannt.

C. Schmidt[2]) beschreibt den morphologischen Charakter und einzelne Eigenschaften des Pigments der Maikäfer.

10 Jahre später veröffentlichte *H. Reinsch*[3]) eine Arbeit über einen braunen Farbstoff des Maikäfers, in der er die Löslichkeitsverhältnisse des Farbstoffs beschreibt, den er aus der Hämolymphe des Maikäfers gewinnen konnte. *T. Ishizaka*[4]) schließlich gibt für das Melanin des Maikäfers die Formel $C_{77}H_{98}N_{14}SO_{33}$ an.

Aus den angeführten Arbeiten ist also, wie man sieht, nichts zu entnehmen, was für die vorliegende Untersuchung zweckdienlich sein konnte.

Da verschiedene Teile des Maikäfers verschieden gefärbt sind, verwandten wir für die entscheidenden Versuche ausschließlich die gleichmäßig braun gefärbten Flügeldecken (3 Proz. des Gesamttrockengewichts). Für die Hauptuntersuchung standen die Flügeldecken von etwa 11000 Maikäfern zur Verfügung. Die Flügeldecken wogen zusammen 145 g. Hieraus konnten etwa 0,2 g Chromogen isoliert werden.

Vorversuche mit Maikäferkörpern ergaben, daß sich das Chromogen in Ligroin (K. P. 30° bis 50°) nicht löst. Deshalb konnten wir zunächst das Fett[5]) mit Hilfe von Ligroin entfernen. Das Chromogen löste sich nebst Begleitstoffen in siedendem Methylalkohol. Diese Begleitstoffe erschwerten die Untersuchung außerordentlich. Denn einerseits steigerten sie die Empfindlichkeit des Chromogens gegenüber Sauerstoff und Alkali sehr stark, andererseits verhinderten sie die Kristallisation des Chromogens. Selbst als Bleisalz oder als Alkylderivat ließ sich das

---

[1]) Für die Bestimmung der Tiere sind wir Herrn Dr. *E. Titschack* vom Zoologischen Museum in Hamburg zu Dank verpflichtet.

[2]) Ann. **54**, 299, 1845.

[3]) Neues Jahrbuch der Pharmazie, Jahrg. 2, **3**, 309, 1855.

[4]) Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **58**, 198, 1908.

[5]) Aus dem Maikäferfett konnten wir Laurinsäure, Myristinsäure und Stearinsäure gewinnen und als Hydrazide oder Phenylhydrazide durch Analyse, Molekulargewichtsbestimmung und Mischschmelzpunkt identifizieren. *Myristinsäurephenylhydrazid* wurde von uns erstmalig hergestellt. Äquimolekulare Mengen Myristinsäure (3 g) und frisch destilliertes Phenylhydrazin (1,5 g) werden ½ Stunde am Rückflußkühler im Ölbad auf einer Temperatur von 145° gehalten. Durch Abkühlen und Umkristallisieren wurden 3,5 g = 83,6 Proz. Myristinsäurephenylhydrazid vom Fp. 103,5° (korrigiert) erhalten. Näheres siehe Dissertation *H.-P. Müller*, Hamburg 1927, „Über das 1-β-3,4-Dioxyphenyl-α-alanin in Vicia Faba L. und Melolontha-Arten“.

Chromogen nicht in reiner Form isolieren. Doch gelang es schließlich, das Chromogen mit Hilfe von Phosgen[1]) als Carbonat[2]) vom Typus

```
   /O—/\
CO    |  |
   \O—\/
```

kristallinisch zu gewinnen. Die Phosgenmethode hat mehrere Annehmlichkeiten: Die Reaktion verläuft eindeutig und nur in einer Richtung. Das Molekül wird nur wenig vergrößert, so daß die Analyse entscheidende Werte liefern kann. Vor allem aber verläuft die Reaktion so schnell, daß die spontane Oxydation und Verharzung des Chromogens in alkalischer Lösung selbst bei Gegenwart von Luft ganz oder fast ganz ausbleiben. Oft scheidet sich das Carbonat auch gleich analysenrein aus.

Analyse und Konstitutionsbestimmung des Chromogens.

Für die Konstitutionsbestimmung standen nur etwa 0,2 g des Carbonats zur Verfügung. Deshalb konnten nur wenige Bestimmungen ausgeführt werden, die aber einander gegenseitig stützen und gemeinsam einen sicheren Schluß erlauben.

Quantitativ durchgeführte Analysen ergaben die Abwesenheit von Schwefel, Halogen, Phosphor und Asche. Die Substanz bestand ausschließlich aus Kohlenstoff, Wasserstoff, Stickstoff und Sauerstoff. Die Verbrennung und die Bestimmung des Molekulargewichts in Phenol im Depressimeter[3]) ergaben für das Carbonat die Bruttoformel $C_{10}H_9O_5N$.

Die Kalischmelze lieferte Protokatechusäure, die durch die Eisenchloridreaktion sowie durch Schmelzpunkt und Mischschmelzpunkt mit synthetischer Protokatechusäure identifiziert wurde.

---

[1]) *A. Einhorn*, Ann. **300**, 135, 1898, stellte zuerst derartige Carbonate von o-Dioxybenzolderivaten mit Hilfe dieser Methode her.

[2]) Um die Methode einzuüben, stellten wir folgende Carbonate und Carbonatderivate her, die in der Literatur bisher nicht beschrieben sind: 1-β-3, 4-Dioxyphenyl-α-alanincarbonat, Zers.-P. 208°; Kaffeesäurecarbonat, Fp. 223°; 2, 3-Dioxynaphthalincarbonat, Fp. 158°; 2, 3-Dioxynaphthalinkohlensäureanilid, Fp. 191°; 2, 3-Dioxynaphthalinkohlensäurephenylhydrazid, Fp. 191°; 2, 3-Dioxynaphthalinkohlensäure-p-nitrophenylhydrazid, Fp. 201°; 2, 3-Dioxynaphthalinkohlensäurepiperidid, Fp. 203°; Mono-2, 3-Dioxynaphthalinkohlensäurehydrazid, Fp. 182°; Di-2, 3-Dioxynaphthalinkohlensäurehydrazid, Fp. 144°. Alle Schmelzpunkte der Arbeit sind korrigiert angegeben. Sämtliche Stoffe wurden durch je zwei vollständige Elementaranalysen identifiziert. Näheres siehe Dissertation *H.-P. Müller*, Hamburg 1927, „Über das 1-β-3, 4-Dioxyphenyl-α-alanin in Vicia Faba L. und in Melolontha-Arten".

[3]) *Houben-Weyl*, Methoden der org. Chem. **1**, 931, 1925.

Da sowohl das gereinigte Extrakt der Maikäferflügeldecken wie das Verseifungsprodukt des reinen Carbonats die Eisenchloridreaktion auf o-Dioxybenzole gaben (grün, mit Alkali rot), ist die Anwesenheit zweier o-ständiger Hydroxylgruppen im ursprünglichen Chromogen erwiesen.

Die Protokatechusäure aus der Kalischmelze zeigt weiter, daß sich mit großer Wahrscheinlichkeit eine und nur eine Seitenkette in 1-Stellung zu den beiden Hydroxylgruppen in 3, 4-Stellung am Benzolkern befindet.

Die *Waser-Brauchli*sche Reaktion[1]) auf α-Aminosäuren mit p-Nitrobenzoylchlorid wies auf das Vorhandensein einer α-Aminosäuregruppe hin.

Das isolierte Carbonat zersetzte sich, genau wie synthetisch hergestelltes l-β-3, 4-Dioxyphenyl-α-alanincarbonat, bei 208^0[2]). Der Zersetzungspunkt des synthetischen l-β-3, 4-Dioxyphenyl-α-alanincarbonats wurde im Gemisch mit dem aus Maikäfern hergestellten Carbonat nicht erniedrigt.

Synthetisch gewonnenes d l-β-3, 4-Dioxyphenyl-α-alanincarbonat zersetzte sich dagegen bei 210^0; ein Gemisch des isolierten Carbonats mit diesem Stoff zeigte eine beträchtliche Depression des Zersetzungspunkts: 206^0. Die spezifische Drehung erwies sich als völlig unbrauchbar für die Charakterisierung der geringen Menge der sehr schwer löslichen Substanz. Dasselbe zeigte sich auch deutlich in Parallelversuchen mit etwa der gleichen Menge synthetischen Carbonats des l-β-3, 4-Dioxyphenyl-α-alanins.

Beschreibung der Versuche.

1. Das Untersuchungsmaterial.

Im Mai 1926 fingen wir in Travemünde an der Ostsee eine große Anzahl Maikäfer [Melolontha melolontha L. und hippocastani F.[3])] ein. Die Tiere wurden in Glasgefäßen mit wenig Essigester getötet. Dann breiteten wir die abgetöteten Tiere in einem trockenen Raume aus. Da ein kräftiger Zugwind den Raum durchstrich, trockneten die Tiere in wenigen Tagen. Um Berührung mit Metall zu vermeiden, brachen wir die distalen[4]) Enden der Flügeldecken ab. Dann zerkleinerten wir

---

[1]) *E. Waser* und *E. Brauchli*, Helv. 7, 481, 1925.

[2]) Wegen der sehr erheblichen Schwankungen der Lage der Zersetzungspunkte je nach der Art des Erhitzens wurden Zersetzungspunkte und Mischzersetzungspunkt stets nebeneinander im gleichen Bad bestimmt.

[3]) Die Flügeldecken *beider* Arten sind, wie besonders hervorgehoben sei. o-dioxybenzolderivathaltig.

[4]) Vom Körper abgewandt.



die Flügeldecken mit Hilfe einer Kugelmühle aus Steingut und trockneten das Mahlgut im luftverdünnten Raume über Phosphorpentoxyd. So entstand ein hellbraunes, staubfeines Pulver.

2. Extraktion des Chromogens.

Zunächst befreiten wir das Flügeldeckenpulver (145 g) durch Extraktion[1]) mit Ligroin (K. P. 30⁰ bis 50⁰) von Fett und Fettsäuren. Dann zogen wir im Verlauf von 10 Stunden das Chromogen nebst einigen Begleitstoffen mittels 750 ccm trockenen Methylalkohols aus. Bei etwa 13 mm Druck und einer Badtemperatur von 30⁰ engten wir den Auszug in einer Kohlendioxydatmosphäre auf 300 ccm ein. Dann fällten wir mittels 300 ccm Wasser Begleitstoffe heraus, filtrierten, engten in der gleichen Weise wiederum auf 300 ccm ein und fällten dann mit 300 ccm Aceton weitere Begleitstoffe. Nun dunsteten wir das Filtrat in der beschriebenen Weise bis zur Trockne ein. Der Rückstand wog 3 g. Er wurde mit ungefähr 40 ccm Wasser extrahiert. Wenige Tropfen der wässerigen Lösung gaben mit einem Tropfen einer 5proz. Eisenchloridlösung[2]) eine starke Grünfärbung, die auf Zusatz von Ammoniak in Violett umschlug.

3. Isolierung des Chromogens als Carbonat.

Die wässerige Lösung des Chromogens wurde unter starker Kühlung mit 10 ccm 50proz. Natronlauge versetzt. Dann wurden bei -5^0 Innentemperatur sofort 35 ccm einer frisch bereiteten 20proz. Lösung von Phosgen in Toluol zugesetzt. Schon nach kurzem Schütteln schied sich das Carbonat in der Toluolschicht kristallinisch ab. Nach der Filtration wurde es nacheinander mit Äther, Alkohol und Wasser gewaschen und bei 50⁰ im luftverdünnten Raume über Phosphorpentoxyd getrocknet.

Ausbeute: 0,2 g.

Siedender Äthylalkohol löst das Carbonat unter weitgehender Zersetzung. Wasser und Äther lösen nicht wesentlich, wohl aber Phenol.

Das Carbonat zersetzt sich, genau so wie das von uns erstmalig synthetisierte Carbonat der l-β-3, 4-Dioxyphenyl-α-aminopropionsäure, bei 208⁰. Auch ein Gemisch dieser beiden Substanzen zersetzte sich bei derselben Temperatur. Dagegen zersetzt sich die entsprechende d, l-Verbindung, die wir ebenfalls synthetisierten, bei 210⁰. Die Gemische gleicher Teile des Carbonats aus dem Maikäferstoff oder aus l-β-3, 4-Di-

[1]) Die Extraktion wurde im Extraktionsapparat von *Schmalfuss* und *Werner*, J. pr. 108, 355, 1924, ausgeführt.

[2]) Aus sublimiertem Eisenchlorid.



oxyphenyl-α-aminopropionsäure mit dem Carbonat der d, l-β-3, 4-Dioxyphenyl-α-aminopropionsäure dagegen ergaben den Zersetzungspunkt 206°.

Elementaranalyse.

I.	0,003478 g	Substanz:	0,006884 g CO_2,	0,001304 g H_2O.
II.	0,004059 g	„	0,008040 g CO_2,	0,001379 g H_2O.
III.	0,013853 g	„	0,752 ccm N_2 (17°, 762 mm).	
IV.	0,007892 g	„	0,425 „ N_2 (17°, 764 „).	

Berechnet für Dioxyphenylalanincarbonat $C_{10}H_9O_5N$:

		C 53,80 Proz.	H 4,07 Proz.	N 6,28 Proz.
Gefunden:	I.	C 53,98 „	H 4,20 „	
	II.	C 54,02 „	H 3,80 „	
	III.			N 6,28 „
	IV.			N 6,06 „

Molekulargewichtsbestimmung.

I.	0,0135 g	Substanz in 6,0462 g Phenol.	Depression	0,804°.
II.	0,0085 g	„ „ 5,4043 g „	„	0,568°.

Berechnet: 223. Gefunden: I. 200, II. 199.

Synthetisches l-β-3,4-Dioxyphenyl-α-aminopropionsäurecarbonat ergab im Vergleich 204.

4. Kalischmelze.

In 5 g schmelzendes Ätzkali trugen wir 0,1 g Carbonat in kleinen Mengen ein. Die Schmelze färbte sich intensiv gelb. Dann lösten wir den Tiegelinhalt in 40 ccm Wasser, neutralisierten mit reiner Salzsäure und ätherten die Lösung aus. Der Rückstand der ätherischen Lösung war gelblich. Mit Eisenchlorid gab er eine grasgrüne Färbung, die mit Ammoniak in Violett umschlug. Die Substanz schmolz bei 192°. Der Mischschmelzpunkt mit Protokatechusäure lag bei 193° (Fp. der Protokatechusäure 194°).

5. Verseifung des Carbonats.

Eine Probe des Carbonats wurde mit gesättigter Sodalösung auf dem Wasserbad verseift. Nach vorsichtigem Ansäuern mit Eisessig gab die Lösung mit Eisenchlorid eine grüne Färbung, die auf Zusatz von Ammoniak in Violett umschlug.

6. Nachweis der α-Aminosäuregruppe.

Eine Probe des Carbonats (etwa 4 mg) wurde in 2 ccm einer 10proz. Sodalösung gelöst. Nach 2 Minuten langem Kochen mit einer Messer-



spitze p-Nitrobenzoylchlorid[1]) färbte sich die Lösung vorübergehend deutlich rotviolett.

7. *Farbstoffbildung.*

Je etwa 4 mg des Carbonats aus Maikäfern und aus l-β-3, 4-Dioxyphenyl-α-alanin wurden auf je einem Uhrglas mit 2 ccm gesättigter Natriumcarbonatlösung versetzt. Die Farben beider Lösungen gingen in gleicher Weise über Rot und Rotbraun in Dunkelbraunschwarz über.

Ergebnis.

Aus den Flügeldecken der Maikäferarten Melolontha melolontha L. und hippocastani F. wurde 3, 4-Dioxyphenyl-alanin, ein Pigmentbildner, isoliert.

Die Untersuchung wird fortgesetzt und auch auf andere Organismen ausgedehnt.

[1]) *E. Waser* und *E. Brauchli*, Helv. 7, 481, 1925.

Wirkung von oberflächenaktiven Stoffen auf die Hefegärung. VII.

Von

Heinrich Zeller.

(Aus der medizinischen Universitätsklinik zu Königsberg i. Pr.)

(Eingegangen am 26. Januar 1927.)

Warburg fand, daß ein indifferentes Narkoticum bei gleicher Konzentration die Gärungsgeschwindigkeit der intakten Hefezelle mehr hemmt als die Gärungsgeschwindigkeit des Hefepreßsafts. Die gleiche Regel fand er auch gültig für die Hemmung der Sauerstoffatmung. Unter seiner Leitung stellte *Dorner* fest, daß die Alkohole der Fettreihe, die Urethanreihe, die Gärung der lebenden Hefe stets mehr hemmen als die Gärung des Preßsafts. Schon früher hatte *Buchner* nachgewiesen, daß Toluol, das die Hefegärung hemmt, auf die Gärung des Preßsafts ohne Einfluß ist. Ähnliches gilt für das Chloroform. *Neuberg* hat Versuche mit Chloroform und Toluol angestellt und gefunden, daß Toluol die Gärung nicht vollständig unterdrückt, daß aber Chloroform sie vollständig aufhebt; die Carboxylase wird dabei nicht geschädigt. *Euler* und *Myrbäck* fanden: Toluol beschleunigt die Selbstgärung der Hefe, Chloroform hemmt sie. *Euler* und *Kuhlberg* fanden, daß Thymol und Toluol die Gärung bis auf 1 Proz. verhindern, Chloroform dagegen nur bis auf 4 Proz. *Euler* selbst hat noch Versuche mit Resorcin und Phenol angestellt; meist tritt dabei eine Steigerung bei niedrigen Dosen auf, die von einer Hemmung gefolgt ist. *Boas* hat mit Saponinen gearbeitet und bei Bierhefe eine Steigerung gefunden; er wandte Konzentrationen von 0,2 bis 5 Proz. an. Auf die schon früher erwähnten Arbeiten von *Neuberg*, der eine Reihe auch oberflächenaktiver Substanzen untersuchte, sei nochmals hingewiesen.

Versuch mit Methylalkohol.

50 g Hefe, 250 g Zucker, 5600 g Wasser werden der zweistündigen Gärung überlassen, dann auf sieben Flaschen verteilt. Alle, außer der Kontrolle, erhalten die unten bezeichneten Mengen Methylalkohols.

Zeit	Kontrolle	0,5 ccm	1,0 ccm	2,0 ccm	5,0 ccm	10,0 ccm	20,0 ccm
2h35′ bis 3h14′	20	14	13	12	14	12	8
3 14 „ 3 58	45	46	40	41	42	32	15
4 17 „ 4 38	45	45	46	43	40	35	17
5 36 „ 5 48	45	45	43	44	45	44	25
6 00 „ 6 12	45	45	43	42	41	42	26

Versuch mit Amylalkohol.

50 g Hefe, 250 g Zucker, 5600 g Wasser werden der zweistündigen Gärung überlassen, dann auf sieben Flaschen verteilt. Alle, außer der Kontrolle, erhalten die unten bezeichneten Mengen Amylalkohols.

Zeit	Kontrolle	0,5 ccm	1,0 ccm	2,0 ccm	5 0 ccm	10,0 ccm	20,0 ccm
2h35′ bis 3h14′	20	20	14	14	8	11	3
3 14 „ 3 58	45	60	72	55	36	28	0
4 17 „ 4 38	45	47	57	52	42	25	0
5 36 „ 5 48	45	47	50	48	38	22	0
6 00 „ 6 12	45	46	47	45	36	23	2

Aus den beiden Versuchen geht hervor, daß Methylalkohol eine anfängliche Hemmung in allen Konzentrationen aufweist. Beim weiteren Verlauf tritt bei 1 : 1600 noch volle Erholung ein, bei den stärkeren Konzentrationen bleibt eine gewisse Hemmung bestehen, die bei 1 : 40 ungefähr 50 Proz. erreicht. Bei noch kleineren Konzentrationen, die hier nicht ausgeführt sind. ist bei 1 : 3000 eine kleine Steigerung festzustellen. Amylalkohol hemmt ebenfalls zu Beginn in einer Konzentration von 1 : 800 an, doch wirkt im weiteren Verlauf noch eine Konzentration von 1 : 400 steigernd auf die Gärung ein; bei 1 : 80 beträgt die Hemmung etwa 50 Proz., bei 1 : 40 hört die Gärung auf.

Nimmt man hierzu noch die früher für Äthylalkohol gefundenen Werte, ebenso die von *Kochmann* und *Kühl* gefundenen Werte, so kann man feststellen, daß Alkohol bei 1 : 500 steigert, bei 1 : 50 um 50 Proz. hemmt. bei etwa 1 : 10 die Gärung aufhebt. Allem Anschein nach stimmt hiermit das *Richardson*sche Gesetz überein: lähmende Wirkung der Alkohole mit steigernder Molekulargröße.

Methylalkohol	hemmt	um	50	Proz.	bei	1 : 40,	steigert	bei	1 : 3000.
Äthylalkohol	,,	,,	50	,,	,,	1 : 50,	,,	,,	1 : 500.
Amylalkohol	,,	,,	50	,,	,,	1 : 80,	,,	,,	1 : 400.

Versuch mit Chloralhydrat.

50 g Hefe, 250 g Zucker, 5600 g Wasser werden der zweistündigen Gärung überlassen, dann auf sieben Flaschen verteilt. Dazu kommen folgende Mengen Chloralhydrats.

Zeit	Kontrolle	0,5 g	1,0 g	2,0 g	5,0 g	10,0 g	20,0 g
3h06' bis 3h45'	45	26	22	20	18	10	3
3 45 „ 4 06	45	32	31	30	25	16	3
4 06 „ 4 22	45	41	41	30	20	6	0
4 22 „ 4 37	45	45	46	39	28	5	0
4 37 „ 4 52	45	46	47	42	30	12	3
4 52 „ 5 16	45	45	42	43	37	20	2

Versuch mit Chloralformamid.

50 g Hefe, 250 g Zucker, 5600 g Wasser werden der zweistündigen Gärung überlassen, dann auf sieben Flaschen verteilt Dazu kommen folgende Mengen Chloralformamids.

Zeit	Kontrolle	0,5 g	1,0 g	2,0 g	5,0 g	10,0 g	20,0 g
3h06' bis 3h45'	45	23	20	22	17	14	8
3 45 „ 4 06	45	24	21	23	20	10	3
4 06 „ 4 22	45	35	34	32	30	18	3
4 22 „ 4 37	45	40	39	33	31	25	3
4 37 „ 4 52	45	44	40	35	34	27	3
4 52 „ 5 16	45	45	41	41	40	33	4

	Chloralhydrat	Chloralformamid
Vorübergehende Hemmung	1 : 1600	1 : 1600
Dauernde Hemmung	1 : 400	1 : 400
Vernichtung	1 : 40	1 : 40
Vorübergehende Steigerung	keine	keine
Dauernde Steigerung	„	„

Nach *Dujardin-Beaumetz* und *Hirne*[1]) wird die Hefegärung durch Chloralhydrat nur wenig beeinflußt; nach *Lissonde* (Thèse de Paris) erst bei 3 Proz. Diese beiden Versuche zeigen, daß Chloralhydrat schon in verhältnismäßig kleinen Dosen hemmen kann. Chloralhydrat und Chloralformamid wirken gleichsinnig; die Formamidgruppe ist hier im Gegensatz zum freien Formamid ohne Wirkung.

[1]) *Dujardin-Beaumetz* und *Hirne*, C. r. 78, 501, 1874.



Versuch mit Chloroform.

50 g Hefe, 250 g Zucker, 5600 g Wasser werden der einstündigen Gärung überlassen, dann auf sieben Flaschen verteilt. Sie erhalten folgende Menge von Chloroform:

Zeit	Kontrolle	1 Tropfen	0,1 ccm	0,2 ccm	0,5 ccm	1,0 ccm	2,0 ccm
12h05' bis 12h56'	40	30	30	19	9	1	1
12 56 „ 1 09	40	35	33	25	5	2	0
1 09 „ 1 29	40	35	34	27	14	2	0
1 46 „ 1 55	40	40	35	30	18	0	0
2 03 „ 2 12	40	39	35	32	18	0	0
2 40 „ 2 54	40	40	40	33	20	0	0

Versuch mit Äther.

50 g Hefe, 250 g Zucker, 5600 g Wasser werden der einstündigen Gärung überlassen, dann auf sieben Flaschen verteilt. Sie erhalten folgende Menge von Äther.

Zeit	Kontrolle	1 Tropfen	0,1 ccm	0,2 ccm	0,5 ccm	1,0 ccm	2,0 ccm
12h05' bis 12h56'	40	29	23	25	12	9	10
12 56 „ 1 09	40	35	33	33	26	23	5
1 09 „ 1 29	40	35	35	34	32	33	7
1 46 „ 1 55	40	40	43	40	47	48	28
2 03 „ 2 12	40	42	47	45	51	51	41
2 45 „ 2 54	40	40	42	44	42	42	40

Salkowski[1]) stellte fest, daß 0,5 Proz. Chloroform die Gärung der Hefe vernichtet. Wird das Chloroform innig mit der Hefeaufschwemmung vermischt, so wie bei diesem Versuch, so ist noch weniger Chloroform zur Aufhebung der Gärung nötig. Vorübergehende Hemmung tritt bei 1 : 40 000, dauernde bei 1 : 4000, Vernichtung bei 1 : 800 auf. Eine Steigerung ist bei den angewandten Mengen nicht zu konstatieren.

Äther zeigt nach vorübergehender Hemmung aller Dosen eine vorübergehende Steigerung um etwa 20 Proz. bei 1 : 8000 bis 1 : 800 (wahrscheinlich Ätherdampf).

Hamburger[2]) stellte Wachstumsbeschleunigung durch kleine Dosen Chloroform fest.

[1]) *Salkowski*, Deutsch. med. Wochenschr. 1888, S. 310.

[2]) *Hamburger*, Phys. chem. Untersuchungen über Phagocyten. Wiesbaden 1912.

Versuch mit Bromoform.

50 g Hefe, 250 g Zucker, 5600 g Wasser werden der einstündigen Gärung überlassen, dann auf sieben Flaschen gefüllt. Sie erhalten folgende Menge von Bromoform, emulgiert in Dextrin:

Zeit	Kontrolle	1 Tropfen	0,1 g	0,2 g	0,5 g	1,0 g	2,0 g
5h02' bis 6h05'	25	20	18	12	10	7	0
6 05 „ 6 26	50	42	40	32	28	14	0
7 02 „ 7 17	50	50	45	35	30	10	0
8 00 „ 8 14	50	50	54	50	39	8	0
10 41 „ 10 56	50	48	50	45	45	30	0
Am and. Tage	50	51	52	48	46	45	0

Versuch mit Aceton.

Die Anordnung ist wie oben, die Flaschen erhalten folgende Menge von Aceton:

Zeit	Kontrolle	0,1 ccm	0,5 ccm	1,0 ccm	2,0 ccm	5,0 ccm	10,0 ccm
5h02' bis 6h05'	25	19	12	10	11	10	8
6 05 „ 6 26	50	40	23	22	17	14	14
7 02 „ 7 17	50	42	40	40	41	36	34
8 00 „ 8 14	50	50	51	52	50	50	48
10 41 „ 10 56	50	51	50	51	50	52	50
Am and. Tage	50	48	48	50	52	50	51

	Bromoform	Aceton
Vorübergehende Hemmung	1 : 24 000	1 : 8000
Dauernde Hemmung	1 : 1 600	keine
Vernichtung	1 : 400	„
Vorübergehende Steigerung	keine	„
Dauernde Steigerung	„	„

Bisher ist über eine Wirkung von Bromoform und Aceton auf Hefe nichts bekannt. Aus dem Vergleich von Chloroform und Bromoform geht hervor, daß letzteres weniger hemmt, was wohl auf die Löslichkeitsverhältnisse zurückzuführen ist. Aceton selbst hemmt nur zu Beginn der Konzentration entsprechend, doch tritt überall völlige Erholung ein.

Versuch mit Amylenhydrat.

50 g Hefe, 250 g Zucker, 5600 g Wasser werden der einstündigen Gärung überlassen, dann auf sieben Flaschen verteilt. Sie erhalten folgende Menge von Amylenhydrat:

Zeit	Kontrolle	0,2 g	0,5 g	1,0 g	2,0 g	5,0 g	10,0 g
1h25' bis 2h22'	20	22	19	19	18	15	10
2 45 „ 3 02	40	44	45	43	47	46	11
3 04 „ 3 18	40	44	44	48	54	45	17
3 18 „ 3 31	40	42	42	44	48	42	20
3 31 „ 3 42	40	42	44	46	48	42	22
3 42 „ 3 54	40	42	42	45	47	42	23

Versuch mit Paraldehyd.

Zeit	Kontrolle	0,2 g	0,5 g	1,0 g	2,0 g	5,0 g	10,0 g
1h25′ bis 2h22′	20	20	18	23	20	11	6
2 45 „ 3 02	40	48	44	45	25	15	7
3 04 „ 3 18	40	50	50	50	45	40	25
3 18 „ 3 31	40	48	48	48	49	38	25
3 31 „ 3 42	40	48	48	48	48	39	26
3 42 „ 3 54	40	48	47	48	48	40	28

	Amylenhydrat	Paraldehyd
Vorübergehende Hemmung	1:160	1:160
Dauernde Hemmung	1: 80	1: 80
Vernichtung	—	—
Vorübergehende Steigerung . . . . / Dauernde Steigerung	1:4000—400	1:4000—400

Amylenhydrat und Paraldehyd zeigen in ihrem Verhalten weitgehende Übereinstimmung; nur ist beim Paraldehyd die Höhe der Steigerung besser.

Werden die hier untersuchten Glieder der Fettreihe in bezug auf Steigerung und Hemmung zusammengestellt, so ergibt sich folgendes:

	Steigerung	Hemmung		Steigerung	Hemmung
Chloroform . . .	keine	1:4000	Paraldehyd . .	18 Proz.	**1:80**
Bromoform . . .	„	1:1600	Äthylalkohol .	10 „	**1:50**
Chloralhydrat . .	„	1: 400	Methylalkohol .	10 „	**1:40**
Chloral. form. .	„	1: 400	Aceton	keine	**keine**
Amylalkohol . .	25 Proz.	1: 80	Äther	„	„
Amylenhydrat .	18 „	1: 80			

Die Reihenfolge wurde nach dem Grade der Giftigkeit gewählt. Aceton und Äther sind ohne Wirkung. Die Alkohole, einschließlich des Paraldehyds, sind verhältnismäßig ungiftig. In kleinen Dosen steigern sie. Sämtliche Verbindungen mit Chlor oder Brom sind viel giftiger und lösen in kleinen Dosen keine Steigerung aus. Es legt sich der Gedanke nahe, an eine Oxydations- oder Reduktionswirkung dieser Substanzen auf die Hefe zu denken.

Versuch mit Toluol.

50 g Hefe, 250 g Zucker, 5600 g Wasser werden der zweistündigen Gärung überlassen, dann auf sieben Flaschen verteilt. Sie erhalten die unten angegebene Menge Toluols.

Zeit	Kontrolle	1 Tropfen	0,1 ccm	0,2 ccm	0,5 ccm	1,0 ccm	2,0 ccm
11h50′ bis 1h01′	30	17	22	22	15	11	10
1 01 „ 1 51	60	40	21	20	10	7	6
1 51 „ 2 20	60	51	37	24	10	4	3
2 20 „ 2 46	60	60	47	38	19	5	3
2 46 „ 3 11	60	61	57	46	22	5	2
3 36 „ 4 01	60	62	64	56	22	7	3

Versuch mit Schwefelkohlenstoff.

50 g Hefe, 250 g Zucker, 5600 g Wasser werden der zweistündigen Gärung überlassen, dann auf sieben Flaschen verteilt. Sie erhalten die unten angegebene Menge Schwefelkohlenstoffs.

Zeit	Kontrolle	1 Tropfen	0,1 ccm	0,2 ccm	0,5 ccm	1,0 ccm	2,0 ccm
11h50' bis 1h01'	30	20	20	13	3	20	11
1 01 „ 1 51	60	74	50	52	13	4	7
1 51 „ 2 20	60	75	55	56	30	0	0
2 20 „ 2 46	60	75	64	60	38	3	0
2 46 „ 3 11	60	75	68	74	45	14	3
3 36 „ 4 01	60	70	74	72	55	27	7

	Toluol	Schwefelkohlenstoff
Vorübergehende Hemmung	1 : 16 000	1 : 16 000
Dauernde Hemmung	1 : 4 000	1 : 1 600
Vernichtung	1 : 400	1 : 400
Vorübergehende Steigerung / Dauernde Steigerung	keine	1 : 16 000

Toluol wirkt auf lebende Hefe schädigend, während Trockenhefe oder Zymase kaum nennenswert beeinflußt werden[1]). Dieser Versuch zeigt, daß schon kleine Mengen Toluols die Gärung der Hefe bedeutend hemmen können. Eine Steigerung ist bei noch kleineren Mengen nicht nachzuweisen.

Schwefelkohlenstoff wirkt nicht so giftig wie das Toluol, steigert dazu in kleinen Dosen. Die Vernichtungsdosis ist ungefähr dieselbe wie beim Toluol.

Versuch mit Thymol.

50 g Hefe, 250 g Zucker, 5600 g Wasser werden der zweistündigen Gärung überlassen, dann auf sieben Flaschen gefüllt. Dazu kommen die unten genannten Mengen von Thymol, gelöst in Alkohol.

Zeit	Kontrolle	0,05 g	0,1 g	0,25 g	0,5 g	1,0 g	2,5 g
6h45' bis 7h36'	45	18	18	10	8	7	5
7 36 „ 8 07	90	33	35	2	1	0	0
8 07 „ 8 31	90	52	58	3	2	0	0
8 31 „ 8 52	90	72	70	2	1	0	0
9 13 „ 9 34	90	85	84	2	1	0	0
10 35 „ 10 58	90	90	80	2	1	0	0
Am and. Tage	90	92	90	2	0	0	0

1) *Buchner* und *Hahn*, Zymasegärung 1903, S. 182.

Versuch mit Benzol.

50 g Hefe, 250 g Zucker, 5600 g Wasser werden der zweistündigen Gärung überlassen, dann auf sieben Flaschen verteilt. Dazu kommt die unten angegebene Menge von Benzol, gelöst in Alkohol.

Zeit	Kontrolle	0,05 g	0,1 g	0,25 g	0,5 g	1,0 g	2,5 g
6h45′ bis 7h36′	45	35	36	35	20	12	9
7 36 „ 8 07	90	52	62	50	14	7	5
8 07 „ 8 31	90	60	65	62	25	7	0
8 31 „ 8 52	90	72	75	65	31	26	3
9 13 „ 9 34	90	90	92	80	36	28	9
10 35 „ 10 58	90	90	88	80	50	34	21
Am and. Tage	90	91	93	80	79	70	45

	Thymol	Benzol
Vorübergehende Hemmung	1 : 16 000	1 : 16 000
Dauernde Hemmung	1 : 8 000	1 : 3 200
Vernichtung	1 : 1 600	1 : 300
Vorübergehende Steigerung	keine	keine
Dauernde Steigerung		

Bernacki[1]) stellte fest, daß Thymol bei 1 : 3000 die Gärung hemmt. Aus diesem Versuch geht dasselbe ungefähr hervor. Außerdem ist zu bemerken, daß der Übergang von der hemmenden zur letalen Dosis ziemlich unvermittelt kommt.

Benzol wirkt viel schwächer als Thymol, auch besteht nur ein allmählicher Übergang zur letalen Dosis.

Versuch mit Lysol.

50 g Hefe, 250 g Zucker, 5600 g Wasser werden der halbstündigen Gärung überlassen, dann auf sieben Flaschen verteilt. Dazu kommt die unten genannte Menge Lysol.

Zeit	Kontrolle	1 Tropfen	0,1 ccm	0,2 ccm	0,5 ccm	1,0 ccm	2,0 ccm
8h42′ bis 9h30′	40	53	48	43	29	13	3
9 30 „ 10 03	40	66	72	75	78	26	3
10 03 „ 10 22	40	55	56	60	60	45	0
10 22 „ 10 38	40	55	50	46	45	40	0
10 55 „ 11 11	40	50	50	47	36	34	0
11 19 „ 11 35	40	50	50	46	32	30	0

[1]) *Bernacki*, s. *Ellinger* im Handb. d. exper. Pharm. 1923.

Versuch mit Kresol.

50 g Hefe, 250 g Zucker, 5600 g Wasser werden der halbstündigen Gärung überlassen, dann auf sieben Flaschen verteilt. Dazu kommt die unten genannte Menge Kresols.

Zeit	Kontrolle	1 Tropfen	0,1 ccm	0,2 ccm	0,5 ccm	1,0 ccm	2,0 ccm
8h42' bis 9h30'	40	34	29	21	15	9	0
9 30 „ 10 03	40	41	32	32	18	8	0
10 03 „ 10 22	40	37	32	32	12	7	0
10 22 „ 10 38	40	37	34	33	11	5	0
10 55 „ 11 11	40	40	37	37	20	6	0
11 19 „ 11 35	40	40	37	38	24	6	0

	Lysol	Kresol
Vorübergehende Hemmung	1:1600	1:20 000
Dauernde Hemmung	1:1600	1: 8 000
Vernichtung	1: 400	1: 400
Vorübergehende Steigerung . . . . . Dauernde Steigerung	1:2000	keine

Lysol zeigt bei kleinen Dosen eine anhaltende Steigerung von 30 Proz. auf; der Übergang von der hemmenden zur letalen Dosis ist ziemlich unvermittelt.

Kresol verursacht keine Steigerung, dafür aber eine allmähliche Schädigung bei höheren Dosen.

Versuch mit nicht emulgiertem Toluol.

50 g Hefe, 250 g Zucker, 5600 g Wasser werden der einstündigen Gärung überlassen, dann auf sieben Flaschen verteilt. Sie erhalten folgende Menge Toluols:

Zeit	Kontrolle	1 Tropfen	0,1 ccm	0,2 ccm	0,5 ccm	1,0 ccm	2,0 ccm
5h36' bis 6h15'	30	25	18	12	3	2	1
6 15 „ 6 33	30	28	24	8	0	0	0
6 33 „ 6 55	60	56	45	18	1	0	0
7 04 „ 7 25	60	60	45	26	2	0	0
8 02 „ 8 23	60	66	54	39	2	0	0
Am and. Tage	60	63	60	61	6	0	0

Versuch mit emulgiertem Toluol.

Emulgierung mit je 2 g Mucilag. gumm. arab.

Zeit	Kontrolle	1 Tropfen	0,1 ccm	0,2 ccm	0,5 ccm	1,0 ccm	2,0 ccm
5h36' bis 6h15'	30	23	19	15	2	1	0
6 15 „ 6 33	30	40	35	25	0	0	0
6 33 „ 6 35	60	70	65	32	0	0	0
7 04 „ 7 25	60	60	56	44	2	0	0
8 02 „ 8 23	60	67	65	44	2	0	0
Am and. Tage	60	64	65	60	4	0	0



	Toluol	Toluol emulgiert
Vorübergehende Hemmung	1 : 16 000	1 : 20 000
Dauernde Hemmung	1 : 4 000	1 : 4 000
Vernichtung	1 : 800	1 : 800
Vorübergehende Steigerung / Dauernde Steigerung	keine	1 : 16 000

Dieser Versuch wurde angestellt, um zu untersuchen, ob es möglich ist, die Wirksamkeit des in Wasser beinahe unlöslichen Toluols durch Emulgierung zu steigern. Es zeigt sich, daß die letale Dosis dieselbe geblieben ist, daß aber das emulgierte Toluol in kleineren Dosen weniger giftig wirkt, sogar eine mäßige Steigerung verursacht (Gummi arab.).

Versuch mit Guajakol.

50 g Hefe, 250 g Zucker, 5600 g Wasser werden der zweistündigen Gärung überlassen, dann auf sieben Flaschen verteilt, alle Flaschen außer der Kontrolle erhalten die unten bezeichnete Menge Guajakols.

Zeit	Kontrolle	1 Tropfen	0,1 ccm	0,2 ccm	0,5 ccm	1,0 ccm	2,0 ccm
10h48′ bis 11h33′	30	25	23	25	21	18	8
11 33 „ 12 13	60	62	65	76	40	23	7
12 13 „ 12 43	60	64	68	70	45	30	5
1 07 „ 1 33	60	59	59	60	50	35	8
1 36 „ 2 20	60	60	59	60	49	41	9

Versuch mit Kreosot.

Die Anordnung ist wie oben. Die Flaschen erhalten die unten bezeichnete Menge Kreosots.

Zeit	Kontrolle	1 Tropfen	0,1 ccm	0,2 ccm	0,5 ccm	1,0 ccm	2,0 ccm
10h48′ bis 11h33′	30	32	22	20	15	8	3
11 33 „ 12 13	60	72	68	38	20	10	1
12 13 „ 12 43	60	69	70	45	25	5	2
1 07 „ 1 33	60	70	73	50	29	10	1
1 56 „ 2 20	60	62	63	51	39	18	0

Brenzcatechin schädigt in 1proz. Lösung die Gärung[1]), ebenso 1proz. Resorcin. Hydrochinon wirkt bei 0,05 Proz. giftig[2]).

Guajakol und Kreosot ähneln sich in ihrem Verhalten, beide steigern in kleinen Dosen und hemmen gleichmäßig absteigend in größeren Dosen.

	Guajakol	Kreosot
Vorübergehende Hemmung	1 : 16 000	1 : 8000
Dauernde Hemmung	1 : 1 600	1 : 4000
Vernichtung	1 : 400	1 : 400
Vorübergehende Steigerung	1 : 4 000	1 : 8000
Dauernde Steigerung	keine	keine

[1]) *Brieger*, Arch. f. Ph. u. A., Suppl. 1879, S. 65.
[2]) *Bokorny*, Chem. Centralbl. **1916, I, 1174.**

Versuch mit Campher.

50 g Hefe, 250 g Zucker, 5600 g Wasser werden der zweistündigen Gärung überlassen, dann auf sieben Flaschen gefüllt, dazu kommen die unten genannten Mengen Camphers, der in etwas Alkohol gelöst ist.

Zeit	Kontrolle	20 mg	50 mg	100 mg	200 mg	500 mg	1,0 g
2h45' bis 3h26'	30	16	12	10	11	15	5
3 36 „ 3 58	30	11	10	13	10	6	3
3 58 „ 4 26	60	17	20	49	50	19	5
6 02 „ 6 23	60	58	57	57	56	52	16
6 34 „ 6 55	60	60	58	60	59	60	26
8 05 „ 8 25	60	59	60	59	57	58	36

Versuch mit Naphthalin.

Die Anordnung ist wie oben. Dazu kommen die unten genannten Mengen Naphthalins, gelöst in etwas Alkohol.

Zeit	Kontrolle	5 mg	10 mg	20 mg	50 mg	100 mg	150 mg
2h45' bis 3h26'	30	14	10	17	10	6	2
3 36 „ 3 58	30	5	5	20	20	26	10
3 58 „ 4 26	60	23	23	46	40	49	26
6 02 „ 6 23	60	63	66	60	36	27	10
6 34 „ 6 55	60	70	68	68	46	33	28
8 05 „ 8 25	60	68	67	60	48	42	28

	Campher	Naphthalin
Vorübergehende Hemmung	1 : 40 000	1 : 160 000
Dauernde Hemmung	1 : 800	1 : 16 000
Vernichtung	—	—
Vorübergehende Steigerung / Dauernde Steigerung	keine	1 : 60 000

Campher hat bei verschiedener Dosierung nur eine vorübergehende Hemmung zur Folge, die nach einiger Zeit beinahe wieder die Höhe der Form erreicht, nur bei 1 : 800 kommt eine dauernde Hemmung zustande.

Naphthalin dagegen hemmt eigenartigerweise zu Beginn um eine mittlere Dosis am wenigsten; später zeigen die kleinen Dosen eine Steigerung, die höheren eine immer stärker werdende Hemmung.

Versuch mit α-Naphthol.

50 g Hefe, 250 g Zucker, 5600 g Wasser werden der einstündigen Gärung überlassen, dann auf sieben Flaschen verteilt. Sie erhalten folgende Menge von α-Naphthol, gelöst in etwas Alkohol.

Zeit	Kontrolle	0,003 g	0,01 g	0,02 g	0,05 g	0,1 g	0,2 g
9h28' bis 10h15'	30	30	20	20	14	8	5
15 15 „ 10 31	30	26	23	22	15	8	2
11 02 „ 11 15	45	37	34	30	20	13	2
11 28 „ 11 41	45	45	42	39	36	15	3
11 52 „ 12 01	45	46	43	40	36	16	4
1 00 „ 1 11	45	48	48	44	38	26	5

Versuch mit β-Naphthol.

50 g Hefe, 250 g Zucker, 5600 g Wasser werden der einstündigen Gärung überlassen, dann auf sieben Flaschen verteilt. Sie erhalten folgende Mengen von β-Naphthol, gelöst in etwas Alkohol.

Zeit	Kontrolle	0,003 g	0,01 g	0,02 g	0,05 g	0,1 g	0,2 g
9h28' bis 10h15'	30	15	12	11	10	3	2
10 15 „ 10 31	30	31	27	20	17	7	3
11 02 „ 11 15	45	46	40	28	26	8	3
11 28 „ 11 41	45	49	51	43	31	15	2
11 52 „ 12 01	45	48	50	47	33	18	3
1 00 „ 1 11	45	47	48	45	35	28	2

	α-Naphthol	β-Naphthol
Vorübergehende Hemmung	1 : 240 000	1 : 240 000
Dauernde Hemmung	1 : 16 000	1 : 16 000
Vernichtung	1 : 4 000	1 : 4 000
Vorübergehende Steigerung . . . . . / Dauernde Steigerung	1 : 240 000	1 : 240 000

α- und β-Naphthol wirken vollkommen gleichartig, höchstens mit einer kleinen Einschränkung, daß β-Naphthol zu Beginn eine stärkere Hemmung verursacht, die aber später durch eine höhere Steigerung ausgeglichen wird.

Versuch mit Gummi arabicum.

50 g Hefe, 5600 g Wasser werden fein gemischt, nach 15 Minuten auf sieben Flaschen verteilt. Jede Flasche erhält erst die unten bezeichnete Gummi-arabicum-Menge, nach 10 Minuten je 35 g Zucker.

Zeit	Kontrolle	0,25 ccm	0,5 ccm	1,0 ccm	2,0 ccm	5,0 ccm	10,0 ccm
11h00' bis 12h15'	18	20	22	20	21	6	5
12 15 „ 1 04	60	48	52	53	60	6	5
1 45 „ 2 04	60	62	58	60	58	7	3
2 26 „ 2 41	60	65	68	66	64	28	5
4 00 „ 4 16	60	60	61	60	62	47	23

Versuch mit Cantharidin.

50 g Hefe werden mit 1400 g Wasser fein zerrührt und auf sieben Flaschen verteilt. 130 mg Cantharidin werden in 1200 ccm Wasser gelöst, davon wird für die einzelnen Flaschen die unten bezeichnete Menge zugeführt, dann das Gesamtvolumen auf 800 ccm gebracht. Nach 15 Minuten erhält jede Flasche 35 g Zucker. Nach 1 Stunde wird mit der Ablesung begonnen.

Zeit	Kontrolle	1 mg	3 mg	6 mg	12 mg	30 mg	60 mg
11h00' bis 12h15'	14	16	16	17	15	15	14
12 15 „ 1 04	60	27	81	20	8	10	14
1 45 „ 2 04	60	60	45	43	11	6	3
2 26 „ 2 41	60	61	48	35	18	6	4
4 00 „ 4 16	60	58	47	40	30	4	4
5 05 „ 5 21	60	60	50	42	33	10	10

Gummi arabicum hemmt von einer bestimmten Konzentration an. Die Hemmung ist reversibel, was die Erholung oben zeigt, und was noch deutlicher wird, wenn die Gärflüssigkeit etwas verdünnt wird. Die bewirkte Hemmung scheint eine mechanische zu sein.

Cantharidin schädigt die Gärung in sehr kleinen Dosen; entsprechend der Dosis ist die bewirkte Hemmung, die bei nicht allzu großer Schädigung um etwas zurückgehen kann.

	Gummi arabicum	Cantharidin
Vorübergehende Hemmung	1 : 3200	1 : 800 000
Dauernde Hemmung	1 : 160	1 : 240 000
Vernichtung	keine	1 : 12 000
Vorübergehende Steigerung	1 : 16 000	keine
Dauernde Steigerung	keine	„

Versuch mit Natriumnitrit.

50 g Hefe, 250 g Zucker, 5600 g Wasser werden der einstündigen Gärung überlassen, dann auf sieben Flaschen gefüllt. Sie erhalten folgende Mengen von Natriumnitrit:

Zeit	Kontrolle	0,05 g	0,1 g	0,2 g	0,5 g	1,0 g	2,5 g
3h10′ bis 4h07′	60	85	25	6	5	2	0
4 07 „ 4 25	60	80	15	2	0	0	0
4 25 „ 4 41	60	78	18	2	0	0	0
5 41 „ 5 58	60	65	20	2	0	0	0
6 30 „ 6 36	60	66	21	2	0	0	0

Versuch mit Amylnitrit.

Bei derselben Anordnung werden folgende Mengen von mit Gummi arab. emulgiertem Amylnitrit genommen:

Zeit	Kontrolle	0,05 g	0,1 g	0,2 g	0,5 g	1,0 g	2,5 g
3h10′ bis 4h07′	60	55	8	5	2	1	0
4 07 „ 4 25	60	65	0	0	0	0	0
4 25 „ 4 41	60	68	0	0	0	0	0
5 41 „ 5 58	60	65	1	0	0	0	0
6 30 „ 6 36	60	66	3	0	0	0	0

	Natriumnitrit	Amylnitrit
Vorübergehende Hemmung	1 : 8000	1 : 8000
Dauernde Hemmung	1 : 8000	1 : 8000
Vernichtung	1 : 4000	1 : 8000
Vorübergehende Steigerung . . . . . / Dauernde Steigerung	1 : 16 000	1 : 16 000

Natriumnitrit und Amylnitrit wirken gleichsinnig, mit dem Unterschied, daß Amylnitrit stärker giftig wirkt. Beide weisen in kleinen Dosen eine Steigerung auf, wird die Dosis aber nur wenig erhöht, so wirkt sie schon deletär.

Versuch mit Terpentinöl.

50 g Hefe, 250 g Zucker, 5600 g Wasser werden der einstündigen Gärung überlassen, dann auf sieben Flaschen gefüllt. Sie erhalten dann die unten bezeichneten Mengen Ol. terebinth. rectif. emulgiert in Wasser.

Zeit	Kontrolle	0,05 g	0,1 g	0,25 g	0,5 g	1,0 g	2,5 g
3h20′ bis 4h34′	30	27	13	25	12	10	10
5 30 „ 5 42	45	48	55	50	50	37	23
6 48 „ 6 59	45	50	54	54	50	40	26
8 00 „ 8 09	45	50	52	54	50	45	30
10 50 „ 11 04	45	48	51	53	52	50	33
Am andern Tage	45	45	44	46	46	47	47

Versuch mit Anilinöl.

Die Anordnung ist wie oben. Die Flaschen erhalten dann die unten bezeichneten Mengen Anilinöls.

Zeit	Kontrolle	0,05 g	0,1 g	0,25 g	0,5 g	1,0 g	2,5 g
3h20′ bis 4h34′	30	23	18	15	12	13	7
5 30 „ 5 42	45	50	45	40	24	10	4
6 48 „ 6 59	45	50	46	42	24	14	6
8 00 „ 8 09	45	45	45	38	26	18	11
10 50 „ 11 04	45	43	41	37	29	26	19
Am andern Tage	45	43	36	31	34	35	32

	Terpentinöl	Anilinöl
Vorübergehende Hemmung	1 : 16000	1 : 16000
Dauernde Hemmung	keine	1 : 3200
Vernichtung	—	—
Vorübergehende Steigerung . . . . . Dauernde Steigerung	1 : 16000	1 : 16000

Terpentinöl und Anilinöl wirken der Konzentration entsprechend zu Beginn hemmend. Terpentinöl zeigt später bei einer ganzen Reihe eine mäßige Steigerung, Anilinöl dagegen weist keine dauernde Steigerung auf und wirkt im ganzen giftiger als Terpentinöl.

Bei der Zusammenstellung der untersuchten Glieder der zyklischen Reihe in bezug auf Hemmung und Steigerung ergibt sich folgendes:

	Steigerung	Hemmung		Steigerung	Hemmung
α-Naphthol . . .	10 Proz.	1 : 16 000	Benzol	keine	1 : 3200
β-Naphthol . . .	10 „	1 : 16 000	Anilinöl	„	1 : 3200
Naphthalin . . .	12 „	1 : 16 000	Lysol	25 Proz.	1 : 1600
Thymol	keine	1 : 8 000	Guajakol . . .	keine	1 : 1600
Kresol	„	1 : 8 000	Campher . . .	„	1 : 800
Toluol	„	1 : 4 000	Hexeton	36 Proz.	1 : 800
Kreosot	„	1 : 4 000	Terpentinöl . .	16 „	keine

Diese Reihe gibt manchen Fingerzeig für weitere Untersuchungen. Auffallend ist die starke Giftigkeit der Naphthole und des Naphthalins, die gleichartig wirken, auch in bezug auf eine geringe Steigerung. Sonst findet

sich eine Steigerung nur beim Terpentinöl und Lysol, die wohl nicht auf das Phenol zurückzuführen ist, und beim Hexeton, die von der Salicylkomponente herrührt.

Versuch mit Psicain.

50 g Hefe, 200 g Zucker, 5600 g Wasser werden der einstündigen Gärung überlassen, dann auf sieben Flaschen verteilt. Sie erhalten folgende Mengen von Psicain:

Zeit	Kontrolle	0,01 g	0,02 g	0,05 g	0,1 g	0,2 g	0,5 g
8h56' bis 9h37'	25	25	26	25	21	20	15
9 37 „ 10 16	40	45	56	42	43	35	28
10 16 „ 10 30	40	43	52	43	41	35	25
11 14 „ 11 26	40	40	43	42	42	35	25
11 47 „ 11 59	40	40	42	42	43	35	25

Versuch mit Nirvanol.

Bei derselben Versuchsanordnung wird für Psicain Nirvanolnatrium genommen.

Zeit	Kontrolle	0,1 g	0,2 g	0,5 g	1,0 g	2,0 g	5,0 g
8h56' bis 9h37'	25	20	19	15	5	4	0
9 37 „ 10 16	40	43	33	27	24	14	8
10 16 „ 10 30	40	44	45	40	26	17	10
11 14 „ 11 26	40	41	42	42	38	38	12
11 47 „ 11 59	40	40	38	38	43	40	12

	Psicain	Nirvanol
Vorübergehende Hemmung	1 : 8000	1 : 8000
Dauernde Hemmung	1 : 8000	1 : 160
Vernichtung	—	—
Vorübergehende Steigerung	1 : 80000	1 : 8000
Dauernde Steigerung	keine	keine

Psicain und Nirvanol bewirken eine vorübergehende Steigerung, bei stärkeren Dosen eine Hemmung. Psicain ist viel giftiger als Nirvanol.

Versuch mit Formalin.

50 g Hefe, 250 g Zucker, 5600 g Wasser werden der einstündigen Gärung überlassen, dann auf sieben Flaschen gefüllt. Folgende Mengen Formalins werden zugefügt, berechnet auf 40 Proz.:

Zeit	Kontrolle	0,01 g	0,02 g	0,05 g	0,1 g	0,2 g	0,5 g
11h38' bis 12h27'	40	38	29	29	11	6	0
12 27 „ 1 03	40	41	36	36	23	13	0
1 46 „ 1 59	40	44	42	40	30	8	1
1 59 „ 2 12	40	48	44	43	32	15	3
2 12 „ 2 25	40	47	45	45	34	15	3
2 37 „ 2 50	40	47	45	44	37	20	3

Versuch mit Hexeton.

50 g Hefe, 250 g Zucker, 5600 g Wasser werden der einstündigen Gärung überlassen, dann auf sieben Flaschen gefüllt. Folgende Mengen Hexetons werden zugefügt, berechnet auf 40 Proz.

Zeit	Kontrolle	0,02 g	0,05 g	0,1 g	0,2 g	0,5 g	1,0 g
11h38' bis 12h27'	40	38	40	34	32	25	5
12 27 „ 1 03	40	42	45	51	50	24	0
1 46 „ 1 59	40	45	50	53	54	41	0
1 59 „ 2 12	40	46	51	52	54	40	0
2 12 „ 2 25	40	47	54	55	55	41	0
2 37 „ 2 50	40	46	54	55	57	42	0

	Formalin	Hexeton
Vorübergehende Hemmung	1 : 40 000	1 : 8000
Dauernde Hemmung	1 : 8 000	1 : 800
Vernichtung	1 : 1 600	1 : 800
Vorübergehende Steigerung . . . . . / Dauernde Steigerung	1 : 80 000	1 : 4000

Formalin steigert in kleinen Dosen und hemmt in absteigender Reihe bei höheren Dosen.

Hexeton steigert bei verschiedenen Konzentrationen. Der Übergang zur vernichtenden Dosis ist ziemlich unvermittelt.

Versuch mit Formamid.

50 g Hefe, 250 g Zucker, 5600 g Wasser werden der einstündigen Gärung überlassen, dann auf sieben Flaschen verteilt. Darauf werden folgende Mengen Formamids zugefügt:

Zeit	Kontrolle	0,02 ccm	0,1 ccm	0,2 ccm	0,5 ccm	1,0 ccm	3,0 ccm
11h03' bis 12h02'	45	47	59	85	65	68	40
12 02 „ 12 28	45	58	59	62	63	62	48
12 28 „ 12 49	45	56	58	60	68	66	58
1 31 „ 1 46	45	52	51	50	56	60	57
1 46 „ 2 01	45	52	53	51	56	60	57
2 45 „ 3 00	45	52	53	52	56	60	60

Versuch mit Eserin.

Die Anordnung ist wie oben, 0,5 g Eserin werden in 5 ccm Wasser gelöst.

Zeit	Kontrolle	0,002 g	0,01 g	0,02 g	0,05 g	0,1 g	0,3 g
11h03' bis 12h02'	45	60	50	45	40	40	35
12 02 „ 12 23	45	55	46	46	42	35	25
12 28 „ 12 49	45	50	48	49	50	40	30
1 31 „ 1 46	45	50	50	48	46	41	32
1 46 „ 2 01	45	48	51	49	46	41	33
2 45 „ 3 00	45	50	50	48	48	43	39

	Formamid	Eserin
Vorübergehende Hemmung	1 : 270	1 : 16 000
Dauernde Hemmung	keine	1 : 2 700
Vernichtung	—	—
Vorübergehende Steigerung / Dauernde Steigerung	1 : 40 000	1 : 400 000

Formamid kann die Gärung bis um 33 Proz. steigern, und zwar dauernd; die anfängliche Steigerung kann noch höher sein. Die Ursache wird mehr auf die N-Komponente als auf die Ameisensäure zurückzuführen sein, ähnlich wie bei den Eiweißspaltproduktenversuchen. Hier möchte ich die Gelegenheit ergreifen und ein Übersehen nachholen. Herr Geheimrat *Abderhalden* schickte mir zwei Arbeiten zu, die wegen Fehlens der Schlußbände in einer Institutsbibliothek, mir nicht zugänglich waren. Er hat darin bei vielen Eiweißspaltprodukten eine Steigerung der Gärung festgestellt, doch meist nur mit einer Konzentration. Über die Ursache der Steigerung, auch beim Insulin, läßt er sich nicht aus. Bei einer Zusammenfassung der Arbeiten komme ich noch darauf zurück.

Eserin wirkt in kleinen Dosen steigernd, in größeren stufenweise hemmend.

Versuch mit Chinin. hydrochl.

50 g Hefe, 250 g Zucker, 5600 g Wasser werden der einstündigen Gärung überlassen, dann auf sieben Flaschen verteilt. Sie erhalten folgende Mengen von Chinin, gelöst in Alkohol:

Zeit	Kontrolle	0,05 g	0,1 g	0,2 g	0,5 g	1,0 g	2,0 g
4h20' bis 5h10'	30	27	25	18	14	13	7
5 10 „ 5 31	30	20	15	13	11	10	5
5 41 „ 6 00	60	43	37	38	36	28	6
6 10 „ 6 28	60	60	48	42	44	40	6
7 00 „ 7 18	60	64	60	62	60	56	5
8 40 „ 9 00	60	63	61	64	64	63	5

Versuch mit Morphium hydrochl.

Die Anordnung ist wie oben. Die Flaschen erhalten folgende Mengen von Morphium hydrochl., gelöst in Alkohol.

Zeit	Kontrolle	0,05 g	0,1 g	0,2 g	0,5 g	1,0 g	2,0 g
4h20' bis 5h10'	30	25	24	22	22	20	10
5 10 „ 5 31	30	30	34	30	25	16	8
5 41 „ 6 00	60	60	65	60	54	41	20
6 10 „ 6 28	60	60	64	58	59	50	36
7 00 „ 7 18	60	63	64	60	56	50	40
8 40 „ 9 00	60	64	65	63	59	56	47

	Chinin	Morphium
Vorübergehende Hemmung	1 : 16 000	1 : 16 000
Dauernde Hemmung	1 : 400	1 : 800
Vernichtung	1 : 400	—
Vorübergehende Steigerung / Dauernde Steigerung	—	1 : 16 000

Chinin hemmt, der Dosis entsprechend, stufenweise. Der Übergang zur letalen Dosis ist ein ziemlich plötzlicher. Nach längerer Gärung tritt bei allen vorangehenden Dosen eine kleine Steigerung auf.

Morphium hemmt in mäßigem Grade bis auf die letzte Konzentration. Bei den vorangehenden tritt bald Erholung ein, bei einigen sogar eine kleine Steigerung.

Versuch mit Blutkohle.

5 g Blutkohle werden mit 100 ccm Wasser + 6 g Gummi arabikum aufgeschwemmt. 50 g Hefe, 250 g Zucker, 5600 g Wasser werden der einstündigen Gärung überlassen, dann auf sieben Flaschen verteilt. Von der aufgeschwemmten Kohle ohne Bodensatz erhalten sie folgende Menge:

Zeit	Kontrolle	1,0 ccm	2,0 ccm	5,0 ccm	10 ccm	20 ccm	50 ccm
11h05' bis 11h55'	30	28	20	21	18	18	12
11 55 „ 12 50	60	51	56	96	65	66	63
12 50 „ 1 14	60	56	60	82	74	75	68
1 14 „ 1 36	60	64	70	90	85	86	76
1 36 „ 1 56	60	60	63	70	70	68	58
1 56 „ 2 16	60	60	62	66	66	64	56

Versuch mit Bariumsulfat.

10 g Bariumsulfat werden mit 100 ccm Wasser + 10 ccm Mucilag. gumm. arab. aufgeschwemmt. Dann wird wie oben verfahren.

Zeit	Kontrolle	1,0 ccm	2,0 ccm	5,0 ccm	10 ccm	20 ccm	50 ccm
11h05' bis 11h55'	30	12	10	10	5	3	5
11 55 „ 12 50	60	41	35	38	23	24	11
12 50 „ 1 14	60	51	50	65	28	19	12
1 14 „ 1 36	60	58	65	67	60	30	20
1 36 „ 1 56	60	59	61	63	58	36	28
1 56 „ 2 16	60	60	59	59	56	37	34

	Blutkohle	Bariumsulfat
Vorübergehende Hemmung	1 : 800	1 : 800
Dauernde Hemmung	keine	1 : 16
Vernichtung	„	—
Vorübergehende Steigerung	1 : 800	1 : 400
Dauernde Steigerung	1 : 400	—

Blutkohle hemmt vorübergehend. Es tritt aber bald Erholung auf mit ziemlicher Steigerung, die um die mittlere Konzentration am stärksten ist. Doch hält sie nicht lange an.

Bariumsulfat wirkt sicher nur mechanisch. So ist die zu Beginn auftretende Hemmung aufzufassen, die bald bis auf die beiden letzten Konzentrationen verschwindet. Durch ein Absetzen der Hefe ist das Zurückbleiben zu erklären.

Stellt man die zuletzt untersuchten Substanzen zusammen, die keiner bestimmten Gruppe angehören, so ergibt sich folgendes:



	Steigerung	Hemmung		Steigerung	Hemmung
Cantharidin . .	keine	1:400000	Chinin	keine	1:400
Amylnitrit . . .	10 Proz.	1: 8000	Nirvanol . . .	„	1:160
Natriumnitrit .	10 „	1: 8000	Gummi arab. .	„	1:160
Formalin . . .	18 „	1: 4000	Bariumsulfat . .	„	1: 16
Psicain	keine	1: 4000	Formamid . . .	36 Proz.	keine
Eserin	12 Proz.	1: 2700	Blutkohle . . .	20 „	„
Morphium . . .	10 „	1: 800			

Alle Stoffe, die hier eine Steigerung der Gärung veranlassen, enthalten Stickstoff; auch bei der Blutkohle ist außer der mehr physikalischen Wirkung an eine Mitwirkung von stickstoffhaltigen Substanzen zu denken. Daß die Wirkung von Amylnitrit und Natriumnitrit nur auf die Nitritgruppe zurückzuführen ist, kann man sicher annehmen. Wie giftig das Psicain sogar auf die Hefezelle wirkt, geht aus der gleichen Hemmungsdosis des Formalins hervor. Auch Eserin wirkt ziemlich giftig. Am giftigsten ist das Cantharidin.

Zusammenfassung.

Die hier untersuchten lipoidlöslichen oder oberflächenaktiven Stoffe haben folgenden Einfluß auf die Gärung:

Aceton, Äther, Terpentinöl, Formamid haben in mittelstarken Dosen keinen hemmenden Einfluß auf die Gärung. Formamid selbst steigert die Gärung, da es zwei Komponenten enthält, die jede für sich steigern können.

Eine Hemmung in einer Verdünnung von 1 : 40 bis 1 : 80 mit einer vorangehenden Steigerung in kleineren Dosen üben aus: Methylalkohol, Äthylalkohol, Paraldehyd, Amylalkohol, Amylenhydrat.

Eine Hemmung in einer Verdünnung von 1 : 400 bis 1 : 8000 ohne vorangehende Steigerung bei kleineren Dosen üben aus: Chinin, Chloralhydrat, Chloralamid bei 1 : 400; Campher bei 1 : 800; Guajakol, Bromoform bei 1: 1600; Benzol, Anilinöl bei 1: 3200; Toluol, Kreosot, Chloroform, Psicain bei 1 : 4000; Thymol, Kresol bei 1: 8000. Lysol wirkt bei 1: 1600, Hexeton bei 1 : 800 hemmend, bei kleinen Dosen wirken sie aber steigernd auf Grund der in ihnen enthaltenen Beimengungen; Formalin wirkt bei 1 : 4000 hemmend, bei kleineren Dosen ebenfalls steigernd, wohl auf Grund der beiden in ihm enthaltenen Komponenten. Morphium und Eserin wirken bei 1 : 800 bzw. 1 : 2700 hemmend, steigern aber in kleineren Dosen; ob diese Steigerung auf Stickstoff beruht, der durch die Hefe leicht abspaltbar ist, ließ sich noch nicht sicher feststellen.

Eine Sonderstellung nehmen Naphthalin und Naphthol ein, die bei 1: 16000 hemmen, in kleineren Dosen aber steigern, genau ebenfalls Amylnitrit und Natriumnitrit, nur beträgt hier die hemmende Dosis 1: 8000. Eine Gruppe für sich bildet wieder das Cantharidin, das bei 1: 400000 hemmt, ohne vorangehende Steigerung.

Mancher dieser genannten Stoffe wurde schon von anderen Autoren, meist bei anderer Fragestellung, untersucht, so besonders von *Neuberg*, *Euler* und ihren Schülern, doch kann ich hier, ohne weitläufig zu werden, die Ergebnisse nicht direkt verwenden, da die Methodik meist eine andere war. Vor der Zusammenfassung aller Versuchsergebnisse möchte ich schon bemerken, daß hier ein Weg sich weist, die Spezifität der Gifte zu untersuchen. Auf eine Fehlerquelle möchte ich dabei aufmerksam machen, die oft unberücksichtigt gelassen wurde: Zu Beginn der Gärung scheiden die Hefezellen bestimmte Substanzen aus, die erst die Einleitung derselben ermöglichen; außerdem wird die Hefe durch schleimartige Substanzen umhüllt, deren Veränderung durch zugesetzte Gifte das eigentliche Ergebnis verschleiern kann. Es handelt sich also um eine Berücksichtigung der Vorgänge außerhalb der Zelle.

Literatur.

Abderhalden, Fermentforschung **6**, 149, 1922; 8, 227, 1925. — *Euler*, Chem. d. Enzyme **1**, 164, 1921. — *Derselbe*, Fermentforschung **1**, 465, 1915. — *Euler* und *Linder*, Chem. d. Hefe. Leipzig 1915. — *Kochmann*, diese Zeitschr. **16**, 391, 1907. — *Neuberg*, ebendaselbst **67**, 12, 1914 u. f. — *Sandberg*, Fermentforschung 8, 232, 1925. — *Warburg-Dorner*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **81**, 99, 1912; Pflügers Arch. **158**, 19, 1912.

Untersuchung über die kombinierte Wirkung zweier Substanzen auf die Hefegärung. VIII.

Von

Heinrich Zeller.

(Aus der medizinischen Universitätsklinik zu Königsberg i. Pr.)

(Eingegangen am 26. Januar 1927.)

Boas fand, daß durch Zusatz von Saponin die Hefegärung gesteigert wird, daß aber eine Salz-Saponinkombination sowohl eine Steigerung wie auch eine Hemmung zur Folge haben kann. Er führt diesen Befund auf eine Änderung des kolloidalen Zustandes der Plasmahautlipoide zurück, wobei Hemmung oder Steigerung der Gärung durch gleichzeitig zugesetzte Salze aus der Anwesenheit von verschiedenwertigen Kationen erklärt werden. *Neuberg* und *Kobel* haben auf Grund der *Boas*schen Anschauung versucht, mit Natriumcholat und Saponin die Permeabilität der lebenden Hefezelle zu steigern, um Hexosediphosphat zur Vergärung zu bringen, ohne Erfolg dabei zu haben. In früheren Versuchen fand *Neuberg* im Hefepreßsaft eine Stimulierung durch Quillayasaponin, Saponin *Merck*, Verodigen, auch durch Digitonin und Cyklamin. Die Gärung lebender Hefezellen wurde gesteigert durch Quillayasaponin, Saponin *Merck*, gehemmt durch Digitonin und Cyklamin. Eine ähnliche Reihe fand *Boas*. Auffallend ist das Verhatten vom Solanin, das einmal eine Steigerung der Gärung hervorruft, dann wieder eine völlige Hemmung. Gallensaure Salze und Säuren zeigen in Kombination mit Salzen ein ähnliches Verhalten wie die Saponine (*Boas*). Schon früher hatte *Neuberg* die Aktivierung der Gärung durch diese Substanzen gefunden. *Boas* beweist, daß die Gallensalze mit den Saponinsubstanzen eine scharf fixierte Sonderstellung einnehmen: sie verändern die Lipoidhüllen, wodurch ungehindert Substanzen ins Zellinnere dringen können. In einer neuen Arbeit hat er diesen Gedankengang weiter ausgeführt.

Für mich handelte es sich in dieser Arbeit um Gewinnung neuer Anhaltspunkte zum Verständnis der Giftwirkung, ohne sich an bisherige Hilfshypothesen zu halten.

Versuch mit Acidum citricum.

50 g Hefe, 250 g Zucker, 5600 g Wasser werden der zweistündigen Gärung überlassen, dann auf sieben Flaschen verteilt. Alle, außer der ersten, erhalten 80 mg Acidum citricum; 10 Minuten später werden die unten genannten Substanzen zugefügt.

Zeit	Kontrolle	Acidum citricum	Acidum citricum				
			1 g NaCl	1 g $CaCl_2$	2 g Ammon.-Acetat	1 g Na-Citr.	2 mg Sublimat
11h00' bis 11h45'	40	35	28	26	60	30	25
11 45 „ 12 16	40	36	39	38	123	44	23
12 48 „ 1 02	40	37	38	35	98	44	20
2 04 „ 2 17	40	39	40	39	105	45	31
2 30 „ 2 43	40	40	44	41	106	45	34
2 56 „ 3 09	40	41	43	42	108	45	34

Es wird so wie oben verfahren; nur werden andere Zusätze gemacht.

Zeit	Kontrolle	Acidum citricum	Acidum citricum				
			1 g Chloralhydrat	0,5 ccm Chloroform	0,5 ccm Toluol	25 mg Phenol	0,2 ccm Formalin
11h00' bis 11h45'	40	35	30	13	10	15	17
11 45 „ 12 16	40	34	30	10	5	15	14
12 48 „ 1 02	40	34	30	5	5	28	20
2 04 „ 2 17	40	38	32	20	9	32	25
2 30 „ 2 43	40	40	36	26	11	35	30
2 56 „ 3 09	40	42	39	33	15	36	32

Dieser Versuch mit Citronensäure brachte ungefähr dasselbe Ergebnis wie der Leerversuch ohne Citronensäure, abgesehen von einer anfänglichen Hemmung, die hier auftrat. So konnte von einer Wiedergabe abgesehen werden. Die Menge der Zusätze wurde beim Natriumchlorid, Calciumchlorid, Natriumcitrat so gewählt, daß eine kleine Steigerung auftrat, die Höhe der übrigen so, daß nach anfänglicher stärkerer Hemmung allmählich noch die Norm erreicht wurde, abgesehen vom Ammoniumsalz, das in der zugeführten Dosis eine Steigerung von 100 bis 150 Proz. bewirkte.

Citronensäure ist ohne Einfluß auf die Gärung, noch bewirken Zusätze eine nennenswerte Änderung.

Versuch mit Oxalsäure.

50 g Hefe, 250 g Zucker, 5600 g Wasser werden der zweistündigen Gärung überlassen, dann auf sieben Flaschen verteilt. Alle, außer der Kontrolle, erhalten 80 mg Oxalsäure. 10 Minuten später werden die unten genannten Zusätze gemacht.

Zeit	Kontrolle	Oxalsäure	Oxalsäure				
			1 g NaCl	1 g $CaCl_2$	2 g Ammon.-Acetat	1 g Na-Citr.	2 mg Sublimat
3h40' bis 4h06'	20	17	15	10	12	10	9
4 36 „ 4 56	40	34	35	28	104	31	12
4 56 „ 5 10	40	38	42	35	112	43	22
5 43 „ 5 56	40	40	45	42	105	47	30
6 44 „ 6 58	40	42	44	42	105	48	34
9 01 „ 9 16	40	42	43	41	108	46	35

Für diesen Versuch wird genau wie oben verfahren, unter Änderung der Zusätze.

Zeit	Kontrolle	Oxalsäure	Oxalsäure				
			1 g Chloralhydrat	0,5 ccm Chloroform	0,5 ccm Toluol	25 mg Phenol	0,2 ccm Formalin
3h40' bis 4h06'	20	11	5	2	5	5	5
4 36 „ 4 56	40	30	14	7	8	17	5
4 56 „ 5 10	40	34	16	5	8	24	5
5 43 „ 5 56	40	36	31	10	22	32	12
6 44 „ 6 58	40	39	37	23	24	35	22
9 01 „ 9 16	40	42	40	28	21	37	27

Oxalsäure hemmt zu Beginn in ähnlicher Weise wie Citronensäure. Zusätze von Natriumchlorid, Phenol sind ohne Wirkung; dagegen hemmen die übrigen im Vergleich mit dem Citronensäureversuch, doch gleicht sich die Hemmung nach einiger Zeit aus, so daß der Zusatz von Oxalsäure gleichgültig ist, bis auf Toluol und Formalin. Von diesen arbeitet ersteres besser, letzteres schlechter.

Oxalsäure + Toluol hemmt weniger als Toluol allein.

Oxalsäure + Formalin hemmt mehr als Formalin allein.

Versuch mit Benzoesäure.

50 g Hefe, 250 g Zucker, 5600 g Wasser werden der zweistündigen Gärung überlassen, dann auf sieben Flaschen verteilt. Alle, außer der Kontrolle, erhalten 40 mg Benzoesäure. 10 Minuten später werden die unten genannten Substanzen zugesetzt.

Zeit	Kontrolle	Benzoesäure	Benzoesäure				
			1 g Na Cl	1 g $CaCl_2$	2 g Ammon.-Acetat	1 g Na-Citr.	2 mg Sublimat
1h00' bis 1h41'	30	30	15	20	37	26	15
1 41 „ 2 12	60	61	44	42	80	42	17
2 27 „ 2 44	60	83	76	70	111	69	32
3 16 „ 3 32	60	81	87	84	127	75	50
3 51 „ 4 07	60	80	85	86	135	80	57
4 23 „ 4 40	60	78	86	88	126	80	64

Es wird wie oben verfahren, unter Änderung der Zusätze.

Zeit	Kontrolle	Benzoesäure	Benzoesäure				
			1 g Chloralhydrat	0,5 ccm Chloroform	0,5 ccm Toluol	25 mg Phenol	0,2 ccm Formalin
1h00' bis 1h41'	30	28	10	5	5	7	8
1 41 „ 2 12	60	58	19	2	3	3	3
2 27 „ 2 44	60	69	50	6	3	6	15
3 16 „ 3 32	60	75	70	8	7	10	44
3 51 „ 4 07	60	84	82	20	18	17	50
4 23 „ 4 40	60	79	80	22	19	20	52

Benzoesäure steigert ohne vorangehende Hemmung die Gärung bis um 33 Proz. Benzoesäure mit Zusätzen hemmt ohne Unterschied zu Beginn die Gärung, später verschwindet die Hemmung bis auf die Versuche mit Chloroform, Toluol, Phenol.

Ergebnis. Benzoesäure steigert die Gärung.

Benzoesäure + Zusätze hemmen zu Beginn die Gärung.

Benzoesäure + Chloroform hemmen dauernd die Gärung mehr als Chloroform allein.

Benzoesäure + Toluol hemmen dauernd die Gärung mehr als Toluol allein.

Benzoesäure + Phenol hemmen dauernd die Gärung mehr als Phenol allein.

Versuch mit Salicylsäure.

50 g Hefe, 250 g Zucker, 5600 g Wasser werden der zweistündigen Gärung überlassen, dann auf sieben Flaschen verteilt. Alle, außer der Kontrolle, erhalten 40 mg Salicylsäure. 10 Minuten später werden die unten genannten Zusätze gemacht.

Zeit	Kontrolle	Salicylsäure	Salicylsäure				
			1 g NaCl	1 g $CaCl_2$	2 g Ammon.-Acetat	1 g Na-Citr.	2 mg Sublimat
5h30' bis 6h17'	30	34	39	24	31	28	18
6 17 „ 6 45	60	64	69	45	58	38	15
7 51 „ 8 07	60	66	82	73	110	65	33
8 25 „ 8 41	60	68	77	70	110	66	35
10 13 „ 10 29	60	70	79	69	127	73	54
8 05 „ 8 54 am andern Tage	60	70	73	69	79	61	76

Es wird wie oben verfahren, unter Änderung der Zusätze.

Zeit	Kontrolle	Salicylsäure	Salicylsäure				
			1 g Chloralhydrat	0,5 ccm Chloroform	0,5 ccm Toluol	25 mg Phenol	0,2 ccm Formalin
5h30' bis 6h17'	30	29	16	14	10	22	14
6 17 „ 6 45	60	65	22	5	2	26	12
7 51 „ 8 07	60	69	54	12	5	52	26
8 25 „ 8 41	60	68	57	18	10	53	30
10 13 „ 10 29	60	68	67	36	25	66	46
8 05 „ 8 54 am andern Tage	60	70	69	64	34	71	68

Salicylsäure steigert um etwa 15 Proz. Salicylsäure + Zusätze hemmen zu Beginn, mit Ausnahme von Natriumchlorid und Phenol, ähnlich wie bei der Oxalsäure. Sonst zeigt sich im Verlauf keine Abweichung von der Norm, bis auf das Phenol, das mit Salicylsäure weniger hemmend wirkt.

Salicylsäure + Phenol hemmen weniger als Phenol allein.

Die Versuche mit Citronen-, Oxal-, Salicyl-, Benzoesäure zeigen, daß dieselben Zusätze je nach dem vorangehenden Säurezusatz eine

verschiedene Wirkung äußern können. Citronensäure selbst ist beinahe ohne Einfluß: Oxalsäure dagegen schwächt die Hemmung durch Toluol ab, verstärkt aber die durch Phenol. Dazu verstärkt Oxalsäure die Hemmung der Zusätze zu Beginn. Salicylsäure wiederum entgiftet etwas die Hemmung durch Phenol, während Benzoesäure die Hemmung durch Chloroform, Toluol, Phenol verstärkt.

Über den inneren Zusammenhang dieser Resultate läßt sich vorerst nichts Abschließendes sagen. Für Oxalsäure und Toluol scheint ein Zusammenhang mit Calcium zu bestehen: Wird Phenol erst zugesetzt, dann Oxalsäure, so tritt keine Entgiftung ein. Die Wirkung der Benzoesäure tritt unabhängig von der Reihenfolge des Zusatzes auf, so daß die Verstärkung der Hemmung als reine Addition beider Wirkungen zu verstehen ist.

Versuch mit Phenol.

50 g Hefe, 250 g Zucker, 5600 g Wasser werden der einstündigen Gärung überlassen, dann auf sieben Flaschen verteilt. Sie erhalten die unten genannten Mengen Phenols.

Zeit	Kontrolle	Phenol 5 mg	10 mg	25 mg	50 mg	100 mg	250 mg
11h30' bis 1h26'	60	34	44	40	40	30	26
1 26 „ 1 51	60	66	62	55	50	41	28
1 51 „ 2 14	60	69	66	63	58	51	36
2 14 „ 2 35	60	67	66	62	58	54	40
3 05 „ 3 25	60	64	63	60	60	56	45
4 10 „ 4 20	60	65	63	61	60	59	50

50 g Hefe, 250 g Zucker, 5600 g Wasser werden der halbstündigen Gärung überlassen, dann auf sieben Flaschen verteilt. Dazu erhält jede Flasche, außer der Kontrolle, je 25 mg Phenol, 10 Minuten darauf die unten genannten Zusätze.

Zeit	Kontrolle	Phenol	Phenol + 1 g NaCl	+ 2 g Ammoniumacetat	+ 1 g Chloralhydrat	+ 0,5 ccm Chloroform	+ 2 mg Sublimat
4h10' bis 4h47'	30	18	24	28	20	8	7
4 47 „ 5 08	30	22	24	37	22	8	12
5 27 „ 5 39	30	28	29	55	23	5	10
5 50 „ 6 00	30	27	29	58	25	5	13
6 35 „ 6 44	30	30	31	51	28	13	18
7 00 „ 7 09	30	31	31	50	28	13	21
8 00 „ 8 09	30	31	31	48	26	17	25

Phenol steigert in der Dosis 1 : 1000000 die Gärkraft der Hefe um 15 Proz. Bei 1 : 200000 besteht zu Beginn eine geringe Hemmung (siehe auch *Euler*). Zusatz von Natriumchlorid, Chloralhydrat ist ohne Einfluß; Zusatz von Ammoniumacetat, Chloroform, Sublimat ergibt eine mäßige Hemmung.

Ammoniumacetat, Chloroform, Sublimat hemmen die Gärung der Phenolhefe in geringem Grade.

Versuch mit Toluol.

50 g Hefe, 250 g Zucker, 5600 g Wasser werden der zweistündigen Gärung überlassen, dann auf sieben Flaschen verteilt. Alle, außer der Kontrolle, erhalten 0,2 ccm Toluol. Eine halbe Stunde später werden die unten genannten Zusätze gemacht.

Zeit	Kontrolle	Toluol	Toluol				
			2 g NaCl	2 g $CaCl_2$	2 g Ammon.-acetat	1 g Na-Citr.	0,2 ccm Formol
4h35′ bis 5h29′	60	45	43	42	102	65	26
5 29 „ 5 51	60	48	46	45	100	60	25
6 24 „ 6 41	60	45	50	38	101	58	34
7 35 „ 7 51	60	55	53	48	124	60	40
8 15 „ 8 31	60	56	60	60	130	60	48
9 18 „ 9 35	60	59	61	60	124	61	58

Bei derselben Versuchsanordnung werden die unten genannten Zusätze gemacht.

Zeit	Kontrolle	Toluol	Toluol				
			0,5 ccm Benzol	0,5 ccm Chloroform	0,5 ccm Amylalk.	0,5 ccm CS_2	0,2 g Saponin
4h35′ bis 5h29′	60	37	13	13	25	2	20
5 29 „ 5 51	60	50	5	2	29	0	17
6 24 „ 6 41	60	51	12	15	38	11	34
7 35 „ 7 51	60	54	15	20	48	18	47
8 15 „ 8 31	60	56	19	30	54	20	54
9 18 „ 9 35	60	60	24	35	56	35	57

Toluol hemmt zu Beginn längere Zeit; Erholung tritt nach einigen Stunden ein. Zusätze von Natriumchlorid, Calciumchlorid, Ammoniumacetat, Formol sind ohne Wirkung. Chloroform, Benzol, Schwefelkohlenstoff dagegen schädigen dauernd, Amylalkohol, Saponin nur vorübergehend.

Toluol allein hemmt etwas.

Toluol + Benzol hemmen dauernd mehr als ohne Toluol.

Toluol + Chloroform hemmen dauernd mehr als ohne Toluol.

Toluol + Schwefelkohlenstoff hemmen dauernd mehr als ohne Toluol.

Toluol + Amylalkohol oder + Saponin hemmen vorübergehend mehr als ohne Toluol.

Toluol + Natriumcitrat heben die hemmende Wirkung des Toluols auf.

Versuch mit Saponin.

50 g Hefe, 250 g Zucker, 5600 g Wasser werden der einstündigen Gärung überlassen, dann auf sieben Flaschen verteilt. Dazu erhalten sie die unten genannten Zusätze.

Zeit	Kontrolle	Saponin					
		1 g NaCl	2 g Ammon.-Acetat	1 g $CaCl_2$	1 g Chloralhydrat	0,5 ccm Chloroform	2 mg Sublimat
7h06′ bis 7h50′	30	35	59	40	31	16	30
7 50 „ 8 05	30	30	52	39	20	7	24
8 05 „ 8 19	30	33	54	40	20	7	26
8 19 „ 8 30	30	33	56	41	21	7	26
8 45 „ 8 55	30	34	63	38	25	11	29
9 04 „ 9 13	30	33	62	34	27	16	28
Am ander. Tage	30	28	45	29	30	28	31

50 g Hefe, 5600 g Wasser werden fein zerrührt. Dazu kommen 5,0 g Saponin *Merck*, 10 Minuten später 250 g Zucker. Nach 1 Stunde wird die Gärflüssigkeit auf sieben Flaschen verteilt, dann genau wie oben verfahren.

Zeit	Kontrolle + Saponin	1 g NaCl	2 g Ammon.-Acetat	1 g $CaCl_2$	1 g Chloralhydrat	0,5 ccm Chloroform	2 mg Sublimat
		+ Saponin					
7h06′ bis 7h50′	62	10	75	46	0	0	4
7 50 „ 8 05	45	52	92	54	29	16	21
8 05 „ 8 19	26	34	88	39	24	18	22
8 19 „ 8 30	24	31	75	34	20	15	18
8 45 „ 8 55	24	28	65	33	23	22	25
9 04 „ 9 13	30	31	70	35	25	20	25
Am ander. Tage	27	25	35	26	22	28	27

Saponin beschleunigt die Triebkraft, hemmt aber die Gärkraft der Hefe. Alle Zusätze hemmen die Beschleunigung der Triebkraft durch Saponin (wenig bei Ammoniumacetat und Calciumchlorid, stark bei Natriumchlorid, Chloralhydrat, Chloroform und Sublimat). Die Gärkraft selbst wird nicht beeinflußt mit Natriumchlorid, Calciumchlorid, Sublimat, Chloralhydrat; gesteigert wird sie durch Ammoniumacetat und Chloroform, absolut und im Vergleich mit der Saponinkontrolle.

Saponin steigert die Triebkraft, hemmt die Gärkraft.

Zusätze hemmen die Triebkraft der Saponinhefe.

Ammoniumacetat steigert die Gärkraft der Saponinhefe.

Chloroform hemmt die Gärkraft der Saponinhefe weniger.

Digitonin-Röntgenversuch. 1proz. alkoholische Digitoninlösung. 100 g Hefe, 250 g Zucker, 5600 g Wasser werden der zweistündigen Gärung überlassen, dann auf sieben Flaschen verteilt. Flasche 3, 5, 7 werden 45 Minuten zusammen bestrahlt, wobei sie nach je 15 Minuten in der Reihenfolge getauscht werden; dann erhalten Flasche 2 und 3 0,1 ccm Digitonin, Flasche 4 und 5 1,0 ccm Digitonin, Flasche 6 und 7 4,0 ccm Digitonin. Flasche 1 wird Kontrolle. Temperatur 22°.

Zeit	Kontrolle	0,1	0,1 . X	1,0	1,0 . X	4,0	4,0 . X
1h00' bis 15'	90	80	81	81	85	42	62
2 00 „ 13	90	95	95	92	94	55	66
2 25	90	97	95	94	96	54	65
2 37	90	97	95	93	90	53	64
2 49	90	95	97	91	87	50	60
3 36 „ 48	90	95	93	88	84	51	57
4 01	90	97	96	90	85	50	58
4 14	90	95	97	90	86	50	57

In Übereinstimmung mit früheren Versuchen wurde hier bestrahlte und nicht bestrahlte Hefe mit steigenden Mengen Digitonins behandelt. In kleiner Dosis wirkt Digitonin steigernd, in größerer hemmend. Ein Vergleich der Dosis 0,1 bei bestrahlter und unbestrahlter Hefe ergibt keinen Unterschied; bei der Dosis 1,0 ergibt sich eine anfängliche Steigerung zugunsten der bestrahlten Hefe, die von einer Hemmung gefolgt ist. Bei der Dosis 4,0 ist die durch Digitonin bewirkte Hemmung bei der bestrahlten Hefe viel kleiner als bei der unbestrahlten.

Versuch mit Cantharidin.

300 mg Cantharidin werden in 9600 g Wasser gelöst, darin werden 84 g Hefe aufgeschwemmt, nach 15 Minuten 420 g Zucker zugesetzt, nach 1½stündiger Gärung wird das Ganze auf 12 Flaschen verteilt. Gleichzeitig werden in 1600 g Wasser 14 g Hefe aufgeschwemmt, nach 15 Minuten 70 g Zucker zugesetzt und ebenfalls 1½ Stunden der Gärung überlassen und auf zwei Flaschen verteilt. Dann werden die unten genannten Zusätze gemacht.

Zeit	Kontrolle	Cantharidin	Cantharidin + 1 g NaCl	+ 2 g Ammon.-Acetat	+ 1 g $CaCl_2$	+ 1 g Na-Citr.	+ 2 mg Sublimat
6h00' bis 6h52'	30	24	18	37	19	15	14
6 52 „ 8 45	150	21	28	153	27	28	15
8 45 „ 9 35	150	20	27	152	36	32	18
9 35 „ 10 16	150	21	25	147	34	31	18
10 16 „ 11 00	150	31	33	141	42	43	30
8 06 „ 9 50							
tags darauf . .	150	83	60	154	88	75	72

Zeit	Kontrolle	Cantharidin	Cantharidin				
			+ 1 g Chloralhydrat	+ 0,5 ccm Chloroform	+ 0,025 g Phenol	+ 0,25 g Zinkacetat	+ 0,25 g Zinksulfat
$6^h00'$ bis $6^h52'$	28	22	16	5	10	10	11
6 52 „ 8 45	150	19	27	5	19	41	17
8 45 „ 9 35	150	18	27	10	30	45	18
9 35 „ 10 16	150	17	26	10	30	43	17
10 16 „ 11 00	150	34	35	15	44	46	27
8 06 „ 9 50							
tags darauf . .	150	85	70	10	92	85	90

Cantharidin allein setzt die Gärung der Hefe stark herab (bis auf 15 Proz.), ein Zusatz von Natriumchlorid schwächt diese Hemmung etwas ab; Ammoniumacetat hebt die Cantharidinwirkung vollkommen auf, ohne dabei die 100proz. Steigerung zu zeigen; Calciumchlorid und Natriumacetat schwächen die Giftwirkung etwas ab, während Sublimat ohne Wirkung ist; Chloralhydrat, Phenol und Zinkacetat schwächen die Cantharidinwirkung ab, Chloroform und Zinksulfat sind dagegen ohne Einfluß.

Cantharidin hemmt die Gärung sehr stark (bis auf etwa $^1/_7$).

Ammoniumacetat hebt diese Hemmung vollständig auf.

Natriumchlorid und Chloralhydrat beschleunigen die Cantharidinhefe um 20 bis 30 Proz.

Calciumchlorid, Natriumcitrat, Phenol, Zinkacetat beschleunigen die Cantharidinhefe um 50 bis 100 Proz.

Versuch mit Tannin.

50 g Hefe, 250 g Zucker, 5600 g Wasser werden der einstündigen Gärung überlassen, dann auf sieben Flaschen gefüllt. Sie erhalten die unten genannten Mengen Tannin. puriss. *Merck.*

Zeit	Kontrolle	Tannin					
		5 mg	10 mg	25 mg	50 mg	100 mg	250 mg
$11^h30'$ bis $1^h26'$	60	38	30	24	20	20	18
1 26 „ 1 51	60	57	50	48	31	26	22
1 51 „ 2 14	60	60	55	60	53	45	30
2 14 „ 2 35	60	63	66	68	56	53	40
3 05 „ 3 25	60	64	67	69	60	56	44
4 10 „ 4 20	60	63	63	66	62	58	46

50 g Hefe, 250 g Zucker, 5600 g Wasser werden der halbstündigen Gärung überlassen, dann auf sieben Flaschen verteilt. Dazu erhält jede Flasche außer der Kontrolle je 25 mg Tannin, nach 10 Minuten die unten genannten Zusätze.

Zeit	Kontrolle	Tannin	Tannin				
			+ 1 g NaCl	+ 2 g Ammon.-Acetat	+ 1 g Chloral-hydrat	+ 0,5 ccm Chloro-form	+ 2 mg Sublimat
4h10' bis 4h47'	30	15	20	44	23	5	7
4 47 „ 5 08	30	36	42	134	37	16	9
5 27 „ 5 39	30	44	48	130	41	17	16
5 50 „ 6 00	30	38	42	96	38	18	18
6 35 „ 6 44	30	33	38	80	30	21	20
7 00 „ 7 09	30	31	35	77	26	23	22
8 00 „ 8 09	30	31	32	71	24	23	21

Röhling hat in einer Dissertation, Erlangen 1905, festgestellt, daß Tannin in einer Konzentration von 0,5 Proz. völlig die Gärung hemmt. Hier wird festgestellt, daß Tannin in kleinen Dosen die Gärkraft um 15 Proz. steigern kann. Zusatz von Kochsalz steigert bis um 30 Proz. Zusatz von Ammoniumacetat kann bis um 300 Proz. steigern. Chloralhydrat ist ohne Wirkung, Chloroform hemmt weniger, Sublimat hemmt mehr mit Tannin als ohne.

Tannin steigert bei 1 : 100000 um 15 Proz.

Tannin + Natriumchlorid steigern bis 30 Proz.

Tannin + Ammoniumacetat steigern bis um 300 Proz.

Tannin + Chloroform wirken weniger giftig als Chloroform allein.

Tannin + Sublimat wirken giftiger als Sublimat allein.

Versuch mit Natriumcitrat.

50 g Hefe, 250 g Zucker, 5600 g Wasser werden der halbstündigen Gärung überlassen, dann auf sieben Flaschen verteilt; dazu bekommt jede Flasche außer der Kontrolle je 1 g Natriumcitrat. 10 Minuten später werden die unten genannten Zusätze zugefügt.

Zeit	Kontrolle	Natriumcitrat	Natriumcitrat				
			+ 2 g Ammon.-Acetat	+ 1 g Chloral-hydrat	+ 1 ccm Aceton	+ 1 ccm Chloro-form	+ 2 mg Sublimat
12h50' bis 1h10'	20	17	13	14	10	2	6
1 10 „ 1 48	45	60	70	64	49	6	20
1 48 „ 2 12	60	61	96	58	57	4	25
2 34 „ 2 48	60	74	120	51	60	3	38
3 15 „ 3 30	60	68	136	60	71	4	48
3 57 „ 4 12	60	72	140	60	70	7	60
5 15 „ 5 32	60	73	146	61	73	20	68

Versuch mit Ammoniumcitrat.

Die Versuchsbedingungen sind dieselben wie oben, nur wird für Natriumcitrat Ammoniumcitrat genommen.

Zeit	Kontrolle	Ammon.-Citrat	Ammoniumcitrat				
			+ 2 g Ammon.-Acetat	+ 1 g Choralhydrat	+ 1 ccm Aceton	+ 1 ccm Chloroform	+ 2 mg Sublimat
12h50′ bis 1h10′	18	15	9	9	7	2	5
1 10 „ 1 48	45	72	60	50	60	5	45
1 48 „ 2 12	58	90	76	65	66	14	54
2 34 „ 2 48	58	99	110	68	90	2	70
3 15 „ 3 30	61	122	116	96	112	2	86
3 57 „ 4 12	60	125	140	102	110	5	100
5 15 „ 5 32	62	120	142	156	120	20	120

Natriumcitrat steigert die Wirkung um 15 Proz. Chloralhydrat hemmt diese Steigerung. Aceton ist ohne Einfluß; 1 g Chloroform hemmt sehr stark.

Ammoniumcitrat steigert um 100 Proz. Chloralhydrat und Aceton hemmen diese Steigerung. Chloroform läßt sie gar nicht aufkommen. Ammoniumcitrat + Zusatz hemmen mehr als Natriumcitrat + Zusatz.

Ergebnis. Auf die Entfaltung der Steigerung durch Ammoniumcitrat wirken Chloralhydrat und Aceton hemmend, Chloroform dagegen verhindert sie ganz.

Versuch mit Ammoniumacetat.

50 g Hefe, 250 g Zucker, 5600 g Wasser werden der zweistündigen Gärung überlassen, dann auf sieben Flaschen verteilt. Alle, außer der Kontrolle, erhalten je 2 g Ammoniumacetat. 10 Minuten später werden die unten genannten Zusätze gemacht.

Zeit	Kontrolle	Ammoniumacetat	Ammoniumacetat				
			+ 0,5 g Saponin	+ 1 g Chloralhydrat	+ 0,5 ccm Chloroform	+ 0,025 g Phenol	+ 10 ccm Gummi arab.
4h30′ bis 4h55′	20	16	17	11	10	13	4
4 55 „ 5 15	30	35	60	21	10	16	1
4 50 „ 4 59	30	53	55	46	42	53	0
6 30 „ 6 37	30	53	52	48	47	53	0
8 35 „ 8 43	30	60	54	53	52	58	16
9 22 „ 9 30	30	61	58	54	52	59	18

Versuch mit Ammoniumcarbonat.

50 g Hefe, 250 g Zucker, 5600 g Wasser werden der zweistündigen Gärung überlassen, dann auf sieben Flaschen verteilt. Alle, außer der Kontrolle, erhalten je 2 g Ammoniumcarbonat. 10 Minuten später werden die unten genannten Zusätze gemacht.

Zeit	Kontrolle	Ammoniumcarbonat	Ammoniumcarbonat + 0,5 g Saponin	+ 1 g Chloralhydrat	+ 0,5 ccm Chloroform	+ 0,025 g Phenol	+ 10 ccm Gummi arab.
4h30′ bis 4h55′	18	17	17	15	10	17	8
4 55 „ 5 15	30	30	60	35	10	28	20
5 50 „ 5 59	30	52	60	49	42	53	38
6 30 „ 6 37	30	55	56	48	44	54	42
8 35 „ 8 43	30	66	53	55	51	64	53
9 22 „ 9 30	30	66	50	56	53	64	52

Ammoniumacetat und -carbonat steigern um etwa 100 Proz. Zusatz von Saponin steigert die Triebkraft, hemmt aber später die Gärkraft. Chloralhydrat hemmt ebenfalls die volle Entfaltung der Gärkraft. Eigenartigerweise ist die Giftwirkung des Chloroforms mit diesen Ammonsalzen abgeschwächt, ebenfalls die Giftwirkung des Phenols. Gummi arabicum hemmt beim Ammoniumacetat die Gärung beinahe vollständig, während sie beim Ammoniumcarbonat nur wenig unter der Norm zurückbleibt.

Versuch mit Saponin.

1. 50 g Hefe, 250 g Zucker, 5600 g Wasser werden der einstündigen Gärung überlassen, dann auf sieben Flaschen verteilt. Dazu kommen die unten genannten Zusätze.

Zeit	Kontrolle	Saponin 2 g Ammon.-Acetat	1 g Chloralhydrat	1 g Chloralformam.	1 ccm Methylviol. konz.	2 mg Phenol	50 ccm Urin
1h06′ bis 1h25′	20	52	25	25	16	17	40
2 10 „ 2 26	30	84	30	31	19	28	63
2 40 „ 2 55	30	90	29	30	20	30	69
3 20 „ 3 36	30	90	28	29	22	32	70
4 41 „ 4 58	30	93	27	30	24	33	68
Am ander. Tage	30	30	25	29	27	31	33

2. 50 g Hefe, 250 g Zucker, 5600 g Wasser werden der zweistündigen Gärung überlassen, dann auf sieben Flaschen verteilt. Jede Flasche erhält 0,08 g Saponin *Merck*. 10 Minuten später werden die unten erwähnten Substanzen zugefügt.

Zeit	Kontrolle + Saponin	Saponin					
		+ 2 g Ammon.-Acetat	+ 1 g Chloralhydrat	+ 1 g Chloralformam.	+ 1 ccm Methylviol. konz.	+ 2 mg Phenol	+ 50 ccm Urin
1h06' bis 1h25'	25	50	27	26	18	25	37
2 10 „ 2 26	38	108	41	38	27	33	63
2 40 „ 2 55	33	90	38	33	27	33	63
3 20 „ 3 36	25	64	20	22	22	24	63
4 41 „ 4 58	20	61	16	18	18	22	54
Am ander. Tage	25	25	15	11	11	16	20

Wird Saponin der in Gärung befindlichen Hefe zugesetzt, so ist nur eine geringe vorübergehende Steigerung festzustellen. Bei der weiteren Gärung ist das Saponin bei den Zusätzen nur insofern von Wirkung, als hier dieselbe Hemmung zum Ausdruck kommt, wie beim Saponin allein.

Zu den Versuchen mit Phenol, Toluol, Saponin, Digitonin, Cantharidin, Tannin ist folgendes zu bemerken: Phenol addiert die Giftwirkung des Sublimats und Chloroforms, die steigernde Wirkung des Ammonacetats läßt es nicht voll aufkommen. Toluol dagegen hemmt mehr in einer Kombination mit Benzol, Chloroform, Schwefelkohlenstoff. Saponin steigert die Wirkung des Ammonacetats, entgiftet das Chloroform. Auf röntgenbestrahlte Hefe wirkt Digitonin weniger ein. Die Hemmung durch Cantharidin, die sehr stark ist, wird durch Ammonacetat ganz aufgehoben, während die anderen Zusätze ebenfalls hohe Beschleunigungen bewirken, besonders Zinkacetat, Calciumchlorid, Natriumcitrat. Auch das Tannin verhält sich merkwürdig: es potenziert die Wirkung des Ammonacetats, entgiftet die Wirkung des Chloroforms teilweise.

Die Ergebnisse zeigen, daß die einzelnen Stoffe ganz spezifisch wirken, jedes hat einen besonderen Angriffspunkt, gerade das Cantharidin und das Tannin machen das sehr deutlich.

Über das Natriumcitrat, Ammoniumcitrat, Ammoniumacetat, Ammoniumcarbonat ist zu sagen, daß Chloralhydrat die volle Entwicklung der Steigerung bei allen Substanzen hemmt; Chloroform hemmt die Entfaltung der Steigerung bei Natrium- und Ammoniumcitrat, bei Ammoniumacetat und Ammoniumcarbonat kaum, wenn auch die etwas höhere Dosis Chloroform bei den ersteren berücksichtigt wird.

Versuch mit Sublimat.

1. 50 g Hefe, 250 g Zucker, 5600 g Wasser werden der einstündigen Gärung überlassen, dann auf sieben Flaschen gefüllt. Dazu kommen die unten genannten Zusätze. 10 Minuten später erhält jede Flasche, abgesehen von der Kontrolle, je 2 mg Sublimat.

Zeit	Kontrolle	1 g Na Cl	1 g Na-citr.	2 g Ammon.-Acetat	1 g $CaCl_2$	1 g Chloral	1 g KJ
		+ Sublimat					
12h05' bis 12h44'	20	19	20	11	14	18	9
12 44 „ 1 15	60	79	75	38	54	48	25
2 00 „ 2 15	60	72	56	58	66	42	23
2 35 „ 2 50	60	57	50	80	54	50	49
3 15 „ 3 29	60	57	55	88	56	52	55
4 30 „ 4 45	60	60	57	98	57	54	56
6 00 „ 6 17	60	60	62	120	58	54	60

2. 50 g Hefe, 5600 g Wasser, 14 mg Sublimat werden gemischt, kurze Zeit darauf 250 g Zucker zugefügt. Nach einstündiger Gärung Verteilung auf sieben Flaschen unter Zusatz der oben erwähnten Substanzen.

Zeit	Kontrolle + Sublimat	Sublimat					
		+ 1 g Na Cl	+ 1 g Na-citr.	+ 2 g Ammon.-Acetat	+ 1 g $CaCl_2$	+ 1 g Chloral	+ 1 g KJ
12h05' bis 12h44'	10	15	7	10	7	10	4
12 44 „ 1 15	32	75	30	60	48	36	14
2 00 „ 2 15	35	61	30	86	59	34	28
2 35 „ 2 15	40	50	45	90	46	47	42
3 15 „ 3 29	48	55	55	96	50	49	49
4 30 „ 4 45	51	55	57	106	52	48	48
6 00 „ 6 17	56	60	60	120	53	60	56

Wird Sublimat wie im obigen Versuch als letztes zugesetzt, so löst es in Verbindung mit Natriumchlorid oder Natriumcitrat keine Hemmung aus, sogar entsteht eine vorübergehende hohe Steigerung; bei den übrigen Salzen kommt es nach Zusatz von Sublimat zu einer Hemmung, bei Ammoniumacetat ist sie am stärksten, bei Calciumchlorid am schwächsten.

Anders ist es, wenn die Zelle erst durch Sublimat vergiftet wird und dann die Zusätze gemacht werden. Wie stark die Hefe durch das Sublimat gestört ist, geht aus dem Vergleich der Normalkontrolle mit der Sublimatkontrolle hervor. Durch Natriumchlorid wird diese Giftwirkung sofort aufgehoben, Natriumcitrat ist hier ohne Wirkung. Ammoniumacetat arbeitet absolut und relativ besser, bringt aber doch nur das Doppelte zustande, was die Sublimatkontrolle anzeigt. Calciumchlorid wirkt etwas entgiftend ein, während beim Jodkali und Sublimat die Reihenfolge gleichgültig ist.

Ergebnis. Vorheriger Zusatz von Natriumchlorid und Natriumcitrat läßt eine Hemmung durch Sublimat nicht aufkommen, während Calciumchlorid, Chloralhydrat, Jodkali, Ammoniumacetat der Reihenfolge nach eine immer stärkere Hemmung zeigen.

Mit Sublimat vergiftete Hefe wird durch Natriumchlorid schnell entgiftet; Natriumcitrat und Ammoniumacetat sind ohne Wirkung; Calciumchlorid hat eine geringe entgiftende Wirkung.

Versuch mit Arsenik.

1. 50 g Hefe, 250 g Zucker, 5600 g Wasser werden der einstündigen Gärung überlassen, dann auf sieben Flaschen verteilt. 15 Minuten nach Zusatz der unten genannten Substanzen erhält jede Flasche, mit Ausnahme der ersten, 30 mg Arsenik.

Zeit	Kontrolle	1 g Na Cl	1 g Na-citr.	2 g Ammon.-Acetat	1 g Ca Cl_2	1 g Chloral	2 mg Sublimat
		+ Arsenik					
5h00′ bis 40′	25	26	27	29	27	20	18
6 02 „ 19	60	47	43	62	58	50	23
6 19 „ 35	60	52	45	70	55	49	26
6 35 „ 50	60	58	52	85	57	52	32
6 50 „ 7h05′	60	63	57	96	58	53	35
7 05 „ 20′	60	63	56	100	59	53	37
9 00 „ 17	60	60	63	100	54	49	45

2. 50 g Hefe, 5600 g Wasser werden gemischt. Dazu kommen 210 mg gelöster Arsenik. Nach 10 Minuten werden 250 g Zucker zugefügt, das Ganze wird 1 Stunde der Gärung überlassen, dann auf sieben Flaschen verteilt unter Zusatz der vorigen Substanzen.

Zeit	Kontrolle + Arsenik	Arsenik					
		+ 1 g Na Cl	+ 1 g Citrat	+ 2 g Ammon.-Acetat	+ 1 g Ca Cl_2	+ 1 g Chloral	+ 2 mg Sublimat
5h00′ bis 40′	11	12	13	15	15	13	9
6 02 „ 19	20	28	25	42	35	18	15
6 19 „ 35	29	48	27	56	45	25	15
6 35 „ 50	40	52	35	67	48	35	18
6 50 „ 7h05′	44	55	45	80	50	38	22
7 05 „ 20	47	57	50	87	50	42	25
9 00 „ 17	48	55	60	100	49	45	40

Durch Zusatz von Arsenik zu Ammoniumacetat leidet die durch letzteres bedingte Gärsteigerung der Hefe. Sublimat + Arsenik addieren sich in ihrer Wirkung. Bei den übrigen ist nur die durch Arsenikzusatz bedingte Hemmung vorhanden.

Arsenikvergiftete Hefe erholt sich schneller bei Zusatz von Natriumchlorid, Ammoniumacetat oder Calciumchlorid. Bei den übrigen ist kein nennenswerter Unterschied zum obigen Versuch zu bemerken.

Zusatz von Arsenik hemmt die volle Entwicklung der Gärsteigerung durch Ammoniumacetat. Sublimat + Arsenik addieren sich in ihrer Wirkung. Arsenikvergiftete Hefe erholt sich schneller nach Zusatz von Natriumchlorid, Ammoniumacetat.

Versuch mit Chloralhydrat.

1. 50 g Hefe, 250 g Zucker, 5600 g Wasser werden der einstündigen Gärung überlassen, dann auf sieben Flaschen verteilt. Dazu kommen die unten genannten Zusätze. Gleich darauf erhält jede Flasche außer der Kontrolle je 1 g Chloralhydrat.

Zeit	Kontrolle	1 g NaCl	1 g Na-citr.	2 g Ammon.-Acetat	1 g $CaCl_2$	2 g Aceton	2 mg Sublimat
		+ Chloralhydrat					
5h05' bis 6h15'	40	42	30	76	72	43	25
6 15 „ 6 36	40	28	13	78	46	35	12
6 36 „ 6 50	40	29	20	80	46	37	20
6 50 „ 7 03	40	30	26	88	45	39	24
7 15 „ 7 28	40	31	28	72	40	41	30
7 28 „ 7 40	40	35	29	76	40	40	31
9 20 „ 9 35	40	36	35	78	40	40	36
Am ander. Tage	40	40	40	68	47	40	42

2. 50 g Hefe, 7 g Chlorhydrat werden gemischt, kurze Zeit darauf werden 250 g Zucker zugefügt und 1 Stunde der Gärung überlassen; dann auf sieben Flaschen verteilt unter Zusatz der oben erwähnten Substanzen.

Zeit	Kontrolle + Chloralhydr.	Chloralhydrat + 1 g NaCl	+ 1 g Na-citr.	+ 2 g Ammon.-Acetat	+ 1 g $CaCl_2$	+ 2 g Aceton	+ 2 mg Sublimat
5h05' bis 6h15'	46	40	16	106	60	37	25
6 15 „ 6 36	38	37	10	95	47	28	25
6 36 „ 6 50	38	37	17	94	45	29	27
6 50 „ 7 03	38	40	35	87	40	35	32
7 03 „ 7 28	36	38	33	85	39	35	32
7 28 „ 7 40	38	40	35	76	40	38	33
9 20 „ 9 35	34	36	34	75	40	37	32
Am ander. Tage	40	38	33	62	40	38	43

Wird Chloralhydrat zu Natriumchlorid oder Natriumcitrat zugesetzt, so entsteht eine dauernde Hemmung, wird es zu Calciumchlorid zugesetzt, so entsteht eine vorübergehende Steigerung. Sublimat + Chloralhydrat ergibt eine mäßige vorübergehende Hemmung.

Mit Chloralhydrat versetzte Hefe zeigt auf Zusatz von Natriumchlorid keine Änderung, wohl aber eine mittlere Hemmung auf Zusatz von Natriumcitrat. Ammoniumacetat steigert und beschleunigt seine Wirkung; ebenfalls Calciumchlorid zeigt zu Beginn eine erhöhte Wirkung.

Versuch mit Pepton Witte.

1. 50 g Hefe, 250 g Zucker, 5600 g Wasser werden der einstündigen Gärung überlassen, dann auf sieben Flaschen verteilt. Dazu kommen die unten genannten Zusätze. 15 Minuten später erhält jede Flasche, abgesehen von der Kontrolle, je 1,5 g Pepton.

Zeit	Kontrolle	1 g NaCl	1 g Na Citrat	2 g Ammon.-Acetat	1 g $CaCl_2$	1 g Chloral	2 mg Sublimat
		+ Pepton					
10h 25' bis 11h 18'	35	60	45	68	53	30	19
11 40 „ 11 55	35	70	62	96	70	33	10
11 55 „ 12 10	35	66	63	93	66	34	10
12 25 „ 12 38	35	62	63	95	61	34	10
12 38 „ 12 49	35	57	58	82	57	32	10
1 28 „ 37'	35	46	55	67	52	30	11
2 15 „ 25	35	40	50	55	47	27	13
3 20 „ 30	35	35	46	50	46	31	11

2. 50 g Hefe, 5600 g Wasser, 10,5 g *Witte*-Pepton werden gemischt, nach 10 Minuten werden 250 g Zucker zugeführt, das ganze dann 1 Stunde der Gärung überlassen, hierauf gleichmäßig verteilt unter Zusatz der oben erwähnten Substanzen.

Zeit	Kontrolle + Pepton	Pepton + 1 g NaCl	Pepton + 1 g Citrat	Pepton + 2 g Ammon.-Acetat	Pepton + 1 g $CaCl_2$	Pepton + 1 g Chloral	Pepton + 2 mg Sublimat
10h 25' bis 11h 18'	105	125	100	80	76	70	50
11 40 „ 11 55	70	94	88	104	80	56	41
11 55 „ 12 10	65	84	84	100	76	54	42
12 25 „ 12 38	55	70	78	95	74	46	41
12 38 „ 12 49	50	66	72	90	72	41	40
1 28 „ 1 37	35	52	60	68	57	32	35
2 15 „ 2 27	27	45	55	60	52	29	31
3 20 „ 3 30	28	40	50	45	50	28	30

Beim oberen Versuch steigert Peptonzusatz zu Beginn und in der Mitte des Versuchs die Wirkung von Natriumchlorid, Calciumchlorid und Ammoniumacetat, dagegen hemmt Chloral jegliche Peptonwirkung; Sublimat wirkt mit Pepton doppelt so giftig.

Wird Pepton der Hefe zu Beginn zugesetzt, so wird dadurch die Trieb- und Gärkraft der Hefe gesteigert, weiterer Zusatz von Kochsalz, Natriumcitrat und Calciumchlorid erhöht die Wirkung der Gärkraft; Zusatz von Ammonacetat läßt nicht ganz die doppelte Steigerung aufkommen. Chloral

kann bei nachherigem Zusatz nur noch die halbe hemmende Wirkung ausüben, auch Sublimat wird durch Pepton teilweise entgiftet.

Werden die Hauptergebnisse der Versuche mit Sublimat, Arsenik. Chloral, Pepton-*Witte* zusammengefaßt, so ergibt sich folgendes:

Sublimat übt, nachträglich den Zusätzen beigegeben, die sonst ungefähr 30 Proz. betragende Hemmung nicht aus, außer bei Ammoniumacetat und Jodkali.

Arsenik übt, nachträglich den Zusätzen beigegeben, die sonst ungefähr 30 Proz. betragende Hemmung nicht aus, abgesehen vom Sublimat und Ammonacetat.

Chloral übt, nachträglich den Zusätzen beigegeben, obgleich allein ohne Wirkung, eine Hemmung von 25 bis 50 Proz. aus. abgesehen von Ammonacetat und Aceton.

Pepton-*Witte* übt, nachträglich den Zusätzen beigegeben. die sonst etwa 100 Proz. betragende Steigerung nicht aus bei Chloral und Sublimat. Bei letzterem macht sich eher eine außerordentliche Hemmung bemerkbar.

Werden die Resultate der Umkehrungen kurz zusammengefaßt, so läßt sich folgendes sagen: Pepton + Sublimat arbeitet dauernd dreimal besser als Sublimat + Pepton. Natriumcitrat + Sublimat arbeitet zu Beginn zweimal besser als Sublimat + Natriumcitrat. Sublimat + Ammonacetat arbeitet zu Beginn zweimal besser als Ammonacetat + Sublimat. Natriumchlorid + Arsenik arbeitet zu Beginn 1½mal besser als Arsenik + Natriumchlorid. Natriumcitrat + Arsenik arbeitet zu Beginn 1½mal besser als Arsenik + Natriumcitrat. Chloral + Ammonacetat arbeitet zu Beginn 1½mal besser als Ammonacetat + Chloral.

Werden noch die Hauptergebnisse der anderen Versuche zusammengefaßt, so ergibt sich folgendes:

Phenol addiert die Giftwirkung von Sublimat, Benzoesäure. Chloroform.

Toluol, Benzol, Chloroform, Schwefelkohlenstoff, Benzoesäure addieren sich in ihrer Wirkung.

Saponin und Tannin entgiften teilweise das Chloroform.

Cantharidin hemmt sehr stark; diese Hemmung wird durch Ammonacetat ganz beseitigt, teilweise durch Zinkacetat, Calciumchlorid. Natriumcitrat.

Die ganzen Ergebnisse sind aber so mannigfaltig, daß sie sich ohne Zwang nicht auf eine einfache Formel bringen lassen. Eine weitere Klärung fand sich bis jetzt in Verfolgung der in der letzten Arbeit

entwickelten Richtlinien. Dazu wird mir eines immer klarer: Es liegen hier nicht einfache Salzwirkungen, verbunden mit einer Aufschließung der Lipoidhülle vor, wie die *Boas*sche Theorie besagt. Es gibt überhaupt sehr wenig Mittel, die die Hefezellen direkt beeinflussen können, ohne dabei grobmechanisch zu wirken. Bei diesen Versuchen führen die Ergebnisse mit den Ammonsalzen zu einem tieferen Verständnis ihrer Wirkungsweise. Im ganzen läßt sich sagen, daß es auf diesem Wege möglich ist, etwas tiefer in die Chemie der Zelle einzudringen.

Literatur.

Boas, diese Zeitschr. **117**, 166, 1921; **129**, 144, 1922; **176**, 349, 1926. — *Lundberg*, Zeitschr. f. Gärungsphysiol. **2**, 223, 1913. — *Neuberg*, diese Zeitschrift **121**, 220, 1921; **126**, 153, 1921/22. — *Neuberg* und *Kobel*, ebendaselbst **174**, 490, 1926.

Beitrag zur Physiologie überlebender Säugetierherzen.

I. Mitteilung:

Eine Modifikation des Locke-Rosenheimschen Apparats.

Von

Zoltán Aszódi und Georg Ambrus.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut der königl. ungar. Universität Budapest.)

(Eingegangen am 27. Januar 1927.)

Mit 2 Abbildungen im Text.

Eine ganze Reihe von Versuchen, die in unserem Institut von 1923 bis 1925 zur Bestimmung des Zuckerverbrauchs überlebender Säugetierherzen am *Locke-Rosenheim*schen Apparat ausgeführt wurden, und die an einer anderen Stelle mitgeteilt werden sollen, haben den überzeugenden Beweis erbracht, daß der genannte Apparat mit so manchen Mängeln behaftet ist, die sich in den Versuchsergebnissen entsprechend fühlbar machen. Diese Mängel bewirken einerseits, daß die Speisung des Herzens keine genügende ist, daher es unter nichts weniger als physiologischen Verhältnissen arbeitet, andererseits, daß bei der Handhabung des Apparats Schwierigkeiten technischer Art erwachsen. *Mängel ersterer Art* sind: Die Speiseflüssigkeit nimmt wohl in der Spirale, die sie durchläuft, die Temperatur des Wasserbads an, in das die Spirale versenkt ist, doch kühlt sie auf dem langen Wege bis zum Herzen um so stärker ab, je langsamer sie in das Herz einströmt. Unter den Bedingungen, die im *Locke-* und *Rosenheim*schen Apparat gegeben sind, tritt die Speiseflüssigkeit unter einem Drucke von 44 mm Hg in die Coronarien ein, was nicht nur von den physiologischen abweichende Verhältnisse, sondern auch zur Folge hat, daß dem Herzen zu wenig Flüssigkeit, namentlich aber zu wenig darin gelöster Sauerstoff zugeführt wird. *Technische Mängel* sind: Um die Speiseflüssigkeit im Apparat von der ursprünglichen Dimension in ununterbrochener Zirkulation zu erhalten, werden 400 ccm Flüssigkeit benötigt, und ist es klar, daß es einen verhältnismäßig großen Zuckerverbrauchs bedarf.

damit die gewöhnlich verwendete Anfangszuckerkonzentration von 0,1 bis 0,2 Proz. einigermaßen erheblich abnehme; eine Vorbedingung verläßlicher Versuchsergebnisse. An keinem der ähnlich konstruierten Apparate ist das stellenweise Auftreten von Gasblasen zu vermeiden, die einerseits die normale Strömung der Flüssigkeit verhindern, andererseits zu Herzembolien führen können; die Entfernung der Gasblasen ist aber an manchen Stellen des ursprünglichen Apparats unmöglich, an anderen Stellen sehr erschwert. Die Dimensionen des Apparats, sowie die zahlreichen Gummischlauchverbindungen erschweren einerseits die vorangehende Sterilisierung der Glasteile, andererseits auch den etwa während der Versuchsdauer erwünschten Wechsel der Speiseflüssigkeit. Endlich führt die an ähnlich konstruierten Apparaten eigentlich nie zu vermeidende Schaumbildung beim ursprünglichen *Locke-* und *Rosenheim*schen Apparat dadurch zu erheblichen Verlusten, daß der Schaum alsbald den ganzen oberen Flüssigkeitsbehälter erfüllt, ja über seinen Rand quillt.

Alle diese Mängel sind in der nachstehend beschriebenen und abgebildeten Modifikation des *Locke- und Rosenheim*schen Apparats gänzlich bzw. größtenteils dadurch behoben, daß a) die Spirale, in der die Speiseflüssigkeit erwärmt wird, und die Herzglocke sich im selben temperierten Raume befindet; b) eine ununterbrochene Zirkulation auch bei Verwendung von bloß 125 ccm Flüssigkeit möglich ist; c) die Flüssigkeit unter einem — übrigens beliebig zu ändernden — Drucke von 110 mm Hg in die Coronarien einströmt; d) das Herz reichlich mit Speiseflüssigkeit — bzw. mit darin gelöstem Sauerstoff — versehen wird (was bei den neu eingerichteten Versuchen daran zu ersehen ist, daß die Flüssigkeit nicht tropfenweise, sondern in kräftigem Strahle vom Herzen ausgespritzt wird; natürlich nur so lange, bis nicht die auch von anderen Autoren beobachtete, zuweilen sehr bald, oft aber erst Stunden später eintretende Verengerung der Herzgefäße nur mehr einen tropfenweisen Durchtritt der Speiseflüssigkeit gestattet); e) die an kritischen Stellen auftauchenden Gasblasen zu jeder Zeit leicht entfernt werden können; f) ein Wechsel der Speiseflüssigkeit ohne Schwierigkeiten vorgenommen werden kann; g) der Apparat leicht auseinanderzunehmen und wieder zusammenzustellen und auch leicht sterilisierbar ist; und endlich, daß h) die schädlichen Folgen der Schaumbildung nach Möglichkeit behoben sind.

A. Der modifizierte Apparat.

Die wichtigsten Bestandteile des modifizierten Apparats (s. Abb. 1) sind die folgenden.

Wanne *W*, die als Thermostat dient; die mit der weiten Mündung nach oben gerichtete Glocke *G*, in der das Herz an einer Kanüle aufgebunden frei



hängt; der Behälter *B*, der die Speiseflüssigkeit enthält; das zylindrische Gefäß *P*, das zur Probenahme dient; das Schlangenrohr *Sch*, in der die Speiseflüssigkeit entsprechend erwärmt wird; das zylindrische Gefäß *T* mit dem Thermometer Th_1, an dem die Temperatur der in das Herz einströmen-

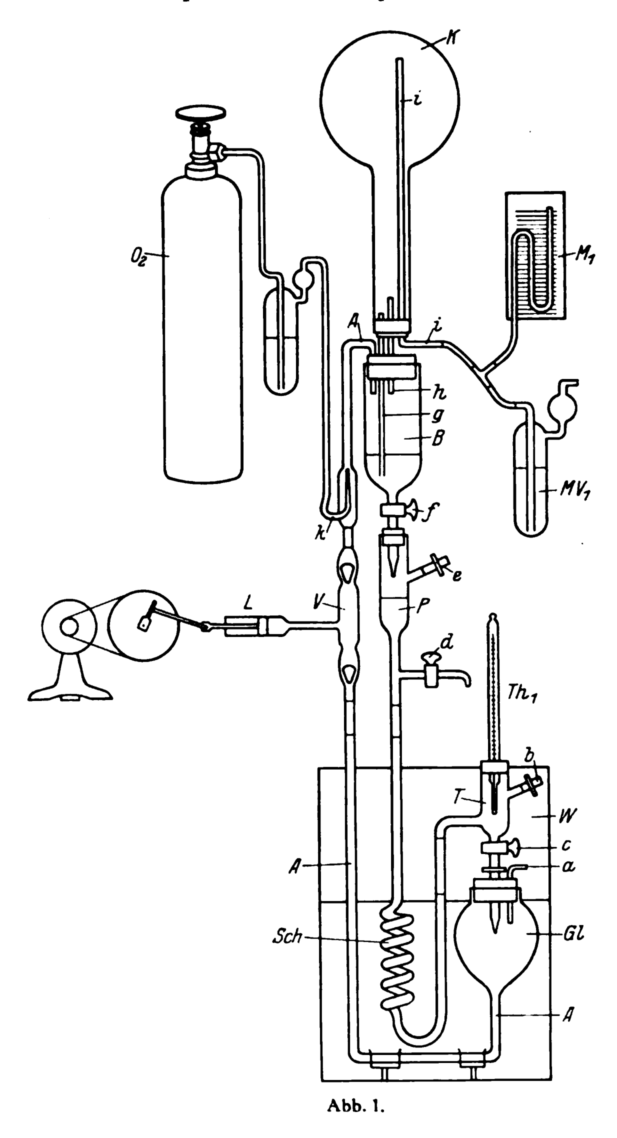


Abb. 1.

den Flüssigkeit abgelesen wird; das Abstromrohr *A*, durch das die Speiseflüssigkeit in den Behälter zurückströmt; der Kolben *K*, in dem sich der gebildete Schaum ansammelt; die Luerspritze *L*, die im Verein mit einem elektrischen Motor und einer von diesem in rotierender Bewegung erhaltenen

Scheibe als Saug- und Druckpumpe wirkt, das Maximumventil MV_1, durch das der Druck, mit dem die Speiseflüssigkeit in das Herz einströmt, auf konstanter Höhe erhalten wird, und das Hg-Manometer M_1, an dem dieser Druck abgelesen wird.

Die vordere und hintere Wand der 48 cm hohen, 26 cm breiten und 22 cm tiefen Wanne *W* sind aus Glas, Seitenwände und Boden aus verzinktem Eisenblech angefertigt und an der nach innen gekehrten Oberfläche mit weißer Ölfarbe angestrichen. Ihre Decke besteht aus zwei Teilen, die an korrespondierenden Stellen halbkreisförmige Ausschnitte tragen, und, zusammengefügt, Glasröhrenleitungen, Thermometer, Thermoregulator usw. durchtreten lassen. Die Wanne ist etwa zur Hälfte mit Wasser angefüllt, das mittels einer kleinen Gasflamme und eines eingeschalteten Hg-Thermoregulators auf der ständigen Temperatur von 40° C gehalten wird. Dadurch, daß die Verlängerung des Schlangenrohrs *Sch*, ehe sie an das Zylinderrohr *T* herantritt, und auch *T* selbst aus dem 40gräd. Wasser herausragen, dabei sich aber innerhalb des Thermostaten bzw. in der durch das Wasser erwärmten Luft befinden, wird bewirkt, daß die Speiseflüssigkeit, solange sie mit der normalen Geschwindigkeit kreist, mit der angenähert konstanten Temperatur von — 38,5° C in das Herz eintritt. Diese Temperatur sinkt nur, wenn die Kreislaufgeschwindigkeit infolge der Verengerung der Coronarien abnimmt, ab. Die linke Seitenwand trägt eine 10 × 12 cm große viereckige Öffnung, die knapp oberhalb des Wasserniveaus angebracht ist, mit einer Schiebeplatte verschlossen werden kann und zum Einführen des Herzens in die Herzglocke dient. Die Menge des Wassers in der Wanne ist so bemessen, daß das Schlangenrohr, durch das die Speiselflüssigkeit erwärmt wird, ganz, die Herzglocke aber bis nahe zu ihrem oberen Rande vom Wasser bedeckt sei. Am Boden der Wanne ruht ein (in der Zeichnung nur durch seine Füße angedeutetes) Messinggestell auf; auf dieses sind an geeigneten Stellen rinnenförmig gebogene Stücke aus federndem Messingblech aufgelötet, die zur Aufnahme und Fixierung der unter Wasser versenkten gläsernen Bestandteile des Apparats dienen. Die aus dem Wasser herausragenden Teile des Apparats werden durch Klemmen an einem Stativ festgehalten, das an den oberen Rand der Wanne geschraubt ist.

Herzglocke *G* und das Rohr *A* für die abströmende Flüssigkeit einerseits, sowie Schlangenrohr *Sch* und deren zwei aufwärts gerichtete Verlängerungen andererseits bilden je *ein* Stück.

Die Herzglocke *G* hat an ihrer oben weiten Mündung eine lichte Weite von 5 cm, etwas weiter unten eine solche von 6 cm; ihre Mündung ist durch einen doppelt durchbohrten Gummistopfen verschlossen. Durch die eine Bohrung ist die Kanüle gesteckt, auf die das Herz bei der Aorta aufgebunden ist, und welche Kanüle durch einen kurzen Gummischlauch mit dem unteren Ende des Zylindergefäßes *T* verbunden wird; durch die andere Bohrung tritt eine kleine, an beiden Enden offene Glasröhre *a*, durch die verhindert wird, daß im Glockeninnern infolge der Aspiration der in der Glocke sich ansammelnden Speiseflüssigkeit ein negativer Druck entstehe. An dem Zylinderrohr *T* sind zwei Röhren seitlich angebracht; die eine ist durch ein kurzes Gummischlauchstück mit der aufwärts gerichteten Verlängerung des Schlangenrohres *Sch* verbunden, über die andere *b* ist ein Stück Gummischlauch gezogen, der mit einem Quetschhahn verschlossen ist. Der verjüngte untere Teil des Zylindergefäßes *T* ist mit einem Glashahn *c* versehen; seine obere weite Mündung ist mit einem Gummistopfen verschlossen,



durch den ein in 0,05° geteiltes Thermometer Th_1 gesteckt ist. Die nach links gelegene Verlängerung des Schlangenrohres *Sch* ist durch ein kurzes Gummischlauchstück mit dem verjüngten Ende des Zylinderrohres *P* verbunden. Dieses trägt seitlich ein dickwandiges, mit einem Glashahn *d* verschließbares Kapillarrohr, das zur Probenahme am Ende einer Versuchsperiode dient; sowie ein kurzes Ansatzrohr *e* mit Gummischlauch und Quetschhahn, der ebenso wie das oben beschriebene zum Ablassen von Luft dient. Die obere Mündung dieses Zylinderrohres *P* ist mit einem Gummistopfen verschlossen, durch dessen Bohrung das verjüngte, mit einem Glashahn *f* verschließbare Ende des Behälters *B* tritt. Dieser Behälter wird durch ein Zylinderrohr gebildet und enthält die Speiseflüssigkeit. Sein Fassungsraum ist 250 ccm, es ist 15 cm hoch, hat eine lichte Weite von 5 cm und trägt an der Vorderfläche eine aufgeätzte Teilung von 5 zu 5 ccm. Stellt man die weiter unten beschriebene Saug- und Druckpumpe ab, durch die die Speiseflüssigkeit von der Herzglocke her in den Behälter zurückbefördert wird, so läßt sich an dieser Teilung das Flüssigkeitsvolumen ablesen, das in der Zeiteinheit aus dem Behälter schwindet bzw. durch die Coronarien strömt. Die obere Mündung des Behälters ist mit einem dreifach durchbohrten Gummistopfen verschlossen. Durch die eine Bohrung tritt das nach oben verlängerte Abstromrohr *A*, durch das die aus der Herzglocke aspirierte Speiseflüssigkeit in den Behälter zurückfließt. Durch die beiden anderen Bohrungen ist je eine Glasröhre *g* und *h* gesteckt, die mit den oberen Enden durch zwei korrespondierende Bohrungen eines anderen Gummistopfens treten. Dieser zweite Gummistopfen verschließt die nach unten gekehrte Mündung eines etwa 2 Liter fassenden umgestülpten Kolbens *K*, der dem von *Ernst* und *Szappanyos*[1]) vorgeschlagenen Schaumfänger nachgebildet und in dieser Stellung an dem erwähnten Stativ befestigt ist. Röhre *g* endet unten knapp über dem Boden des Behälters, oben knapp über dem Gummistopfen des Kolbens, Röhre *h* aber einige Millimeter unterhalb des unteren und einige Millimeter oberhalb des oberen Gummistopfens. Der im Behälter namentlich zu Beginn des Versuchs sich ansammelnde Schaum tritt bei Röhre *h* in den Kolben über und wird dort weit hinaufgetrieben; verflüssigte Anteile des Schaumes fließen aber bei Rohr *g* wieder in den Behälter zurück. Der Stopfen, der den umgestülpten Kolben verschließt, trägt auch eine dritte Bohrung; durch diese ist eine Glasröhre *i* gesteckt, die mit dem einen Ende hoch hinauf bis knapp unter den Boden des umgestülpten Kolbens hinanreicht, mit dem anderen Ende aber mit dem Schaft eines T-Rohres verbunden ist; der eine Schenkel des T-Rohres steht mit einem Hg-Maximumventil MV_1, der andere mit einem Hg-Manometer M_1 in Verbindung. In das Abstromrohr *A*, das die in der Herzglocke angesammelte Speiseflüssigkeit zu dem Behälter zurückführt, ist knapp oberhalb der Wanne ein T-Rohr *V* eingeschaltet, dessen Schaft mit einer Saug- und Druckpumpe in Verbindung steht, dessen beide Schenkel aber je ein sorgsam eingeschliffenes gläsernes Ventil enthalten.

Die Saug- und Druckpumpe wird durch eine 10 ccm fassende Luerspritze *L* gebildet, deren genau eingeschliffener metallischer Pumpenstiefel durch ein doppeltes Armgelenk hin- und rückläufig bewegt wird, und zwar von einer Scheibe aus, die durch einen elektrischen Motor in rotierender Bewegung erhalten ist. In der einen Phase wird von der Pumpe eine Saugwirkung ausgeübt: dann schließt das obere Ventil den Zugang nach oben,

[1]) *Z. Ernst* und *B. Szappanyos*, diese Zeitschr. **157**, 18, 1925.



das untere Ventil aber gestattet den Durchgang von unten her, so daß die Speiseflüssigkeit von der Herzglocke her aspiriert wird; in der nächsten Phase übt die Pumpe eine Druckwirkung aus: das untere Ventil sperrt den Durchgang nach unten, gestattet hingegen, daß die Speiseflüssigkeit nach oben gegen den Behälter zu ausweiche.

Etwas weiter oberhalb ist in das Abstromrohr seitlich eine Glasröhre *k* eingeschmolzen, die mit dem äußeren weiteren Ende an eine Sauerstoffdruckflasche O_2 (mit dazwischengeschaltetem Blasenzähler) verbunden ist, während ihr dünn ausgezogenes anderes Ende frei im Lumen des Abstromrohres emporragt. Durch den Sauerstoff, der durch die emporgehobene Speiseflüssigkeit perlt, wird diese gesättigt, andererseits aber auch der Druck vermehrt, mit dem die Flüssigkeit in die Coronarien einströmt. Ein Druck von etwa 30 mm Hg wird nämlich bereits durch den Höhenunterschied zwischen dem Flüssigkeitsniveau im Behälter und den tiefer gelegenen Coronarien erzeugt. Hierzu kommt der Druck, der von einströmendem Sauerstoff auf die Oberfläche der Flüssigkeit in dem Behälter ausgeübt wird, und dank dem Maximumventil auf der angenähert konstanten Höhe von 80 mm Hg gehalten wird. Auf diese Weise ergibt sich ein ständiger Druck von 110 mm Hg, mit dem die Speiseflüssigkeit in die Coronarien eintritt.

Die Dimensionen des Behälters *B* und der Herzglocke *G* sind oben bereits angegeben. Das Proberohr *P* und das Rohr *T* hat am oberen weiteren Teil eine lichte Weite von 19 bis 20 mm, die unteren ausgezogenen Teile dieser beiden, desgleichen auch Schlangenrohr *Sch*, Abstromrohr *A*, sowie alle anderen den Apparat bildenden Glasröhrenstücke eine solche von 5 bis 6 mm.

B. Ausführung der Versuche.

Von den Einzelheiten der Versuchstechnik seien hier selbstredend nur diejenigen angeführt, die von der allgemein bekannten und geübten mehr oder minder abweichen, und denen es — nebst der Ausmerzung der dem ursprünglichen Apparat innewohnenden Fehler — zu verdanken ist, daß unsere Ergebnisse von denen früherer Autoren meistens erheblich abweichen und, wie wir meinen, besser sind als jene.

Reinwaschen der Herzgefäße und Befestigung der Kanüle am Aortenstumpf. Eine der Hauptbedingungen, von denen das Gelingen der Versuche an überlebenden Herzen abhängt, ist, daß die Blutgefäße von Blut möglichst freigewaschen seien. Dies wird am besten wie folgt erreicht. Noch während das Blut des mit Äther narkotisierten Tieres der in die Carotis eingebundenen Kanüle entströmt, wird mit Infusion körperwarmer Tyrodelösung durch eine in die Vena jug. ext. eingebundene Kanüle unter einem Druck von 80 mm Hg begonnen und damit so lange fortgesetzt, bis der Carotis eine nunmehr *beinahe* ungefärbte Flüssigkeit entströmt. Die Tyrodelösung wird vorangehend durch 2 Stunden langes Durchströmen mit Sauerstoff gesättigt und dadurch auf Körpertemperatur erhalten, daß die ungefähr 2½ Liter

fassende Flasche (Abb. 2), die sie enthält, in ein Wasserbad von etwa 38° C versenkt ist. Die Mündung der Flasche *Fl* ist durch einen dreifach durchbohrten Gummistopfen verschlossen. Durch die eine Bohrung ist ein Thermometer Th_2 gesteckt, durch die zweite Bohrung tritt die Röhre *l*, die knapp unter dem Gummistopfen in der Flasche *Fl* endet und mit einer Sauerstoffdruckflasche in Verbindung steht; durch die

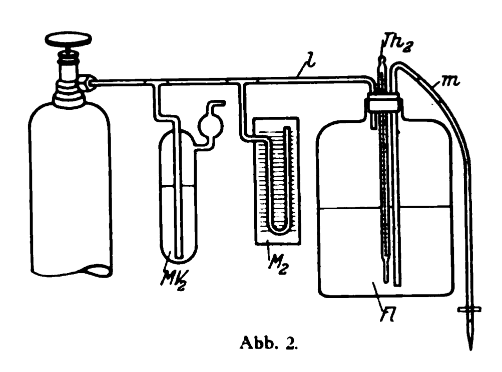


Abb. 2.

dritte Bohrung tritt aber Röhre *m*, die knapp über dem Boden der Flasche *Fl* endet und mit einem Gummischlauch verlängert der Jugularis die erwärmte Tyrodelösung zuführt. Zwischen Röhre *l* und der Sauerstoffdruckflasche ist das mit Hg beschickte Maximumventil MV_2, sowie das Hg-Manometer M_2 eingeschaltet. Am Hunde werden in der Regel etwa 2½, an der Katze 1, an Kaninchen etwa ¾ Liter Waschflüssigkeit benötigt, bis sie beinahe ungefärbt abläuft.

Nun wird das Herz in der bekannten Weise bloßgelegt, in die unmittelbar unter dem Truncus anonymus angeschnittene Aorta eine Glaskanüle eingebunden, die in der Bohrung des aus der Mündung der Herzglocke genommenen Gummistopfens steckt. Über die weite Mündung der Kanüle ist ein kurzer, mit einer Schraubenklemme versehener Gummischlauch gezogen. Hat man die Kanüle vorangehend vom weiteren Ende her mit Tyrodelösung gefüllt und die Schraubenklemme zugezogen, so bleibt die Flüssigkeit in der Kanüle stehen, und kann letztere im gefüllten Zustande in die Aorta eingebunden werden, was zur Verhütung einer Luftembolie der Herzgefäße durchaus nötig ist.

Da das Reinwaschen der Herzgefäße von der Jugularis aus nie vollständig gelingt, werden in bekannter Weise die in den Herzhöhlen verbliebenen Blutreste durch vorsichtiges Massieren des Herzens herausbefördert, Blutreste aber, die im Aortenstumpf zurückgeblieben sind, wie ebenfalls bereits von anderer Seite vorgeschlagen, durch einen Strahl von Tyrodelösung herausgeschwemmt, der einer etwa 20 cm

langen, dünnen, bis zu den Semilunarklappen eingegeführten Metallkanüle entströmt.

Vollständig blutfrei wird das Herz auf folgende Weise gemacht. Wir lösen das Herz mit einem Scherenschlag von der Umgebung vollends los, verbinden die Kanüle an ihrem freien Ende mit der verlängerten Röhre *m* der Waschvorrichtung und lassen unter einem Drucke von 80 mm Hg so lange Tyrodelösung durchströmen, bis die Flüssigkeit nunmehr vollständig farblos abläuft (was in der Regel nach etwa 8 Minuten der Fall ist). Inzwischen hat sich das Herz, das bei der Herausnahme aus dem Brustkorb nur mehr schwach pulsierte, zusehends erholt, so daß es, sich kräftig kontrahierend, die Speiseflüssigkeit im Strahle aus sich stößt.

Einfüllung der Speiseflüssigkeit in den Apparat. Während dieser Manipulationen wird von der Assistenz der Apparat auf folgende Weise mit der Speiseflüssigkeit beschickt. Je nach der Größe des Herzens, das zur Untersuchung gelangt, läßt man durch einen Trichter 100 bis 150 ccm der Lösung in die Herzglocke *G* einfließen und sie bei geschlossenem Glashahn *f* durch die Saug- und Druckpumpe in dem Behälter emportreiben. Öffnet man nun bei abgestelltem Motor den Glashahn *f*, so strömt die Flüssigkeit abwärts, füllt nicht nur das Schlangenrohr und dessen beide Schenkel, sondern auch das zylindrische Gefäß *T*, wobei allerdings unter dem Stopfen ein mit Luft gefüllter Raum zurückbleibt. Sie wird von hier durch vorsichtiges Lockern des Quetschhahns bei *C* vertrieben und damit erreicht, daß der Hg-Behälter des Thermometers *Th* vollkommen von der Lösung umspült wird. In *P* wird das Flüssigkeitsniveau nach demselben Prinzip durch Lockern des Quetschhahns bei *e* eingestellt, wobei es zweckmäßig ist, zwischen Flüssigkeitsoberfläche und dem ausgezogenen Ende des Behälters *B* einen kleinen Zwischenraum zu belassen, da auf diese Weise die Geschwindigkeit kontrolliert werden kann, mit der die Lösung gegen das Herz strömt. *Unerläßlich ist es, dafür zu sorgen, daß die Flüssigkeitssäule nirgends Luftblasen enthalte, die zur Embolie und zum Herzstillstand führen können.*

Einschaltung des Herzens in den Kreislauf. Das inzwischen reingewaschene Herz wird nun mitsamt der im Gummistopfen steckenden Kanüle, dem darüber gezogenen Gummischlauch und der Schraubenklemme beim seitlichen Fenster der Wanne in dessen Innenraum gebracht, in die Glocke *G* eingesetzt, der Gummischlauch bei gelockerter Schraubenklemme mit dem in die Glocke ragenden Ende von *T* verbunden, Glashahn *c* geöffnet, die in die Kanüle oder in den Schlauch gelangte Luft mit den Fingern nach oben gestreift. Öffnet man jetzt den Glashahn *f* und bringt die Saug- und Druckpumpe in Gang, so

ist die Zirkulation durch Herzgefäße und Apparat hergestellt. Bei einiger Übung erheischt das Aussetzen des Herzens bis zum Beginn des eigentlichen Versuchs nicht mehr als 20 bis 30 Sekunden.

Wechsel der Speiseflüssigkeit. Um den Zuckerverbrauch des Herzens bzw. auch andere gleichzeitig stattfindende Umsetzungen in ihrem zeitlichen Verlauf verfolgen zu können, führen wir prinzipiell alle Versuche in mehreren Perioden aus und müssen aus diesem Grunde am Ende jeder Periode die Speiseflüssigkeit wechseln. Dies geschieht wie folgt. Nachdem die Saug- und Druckpumpe abgestellt und bei der Ablaßöffnung *d* eine entsprechende Menge der Flüssigkeit entnommen wurde, wird Glashahn *c* und *f* gesperrt, die Schraubenklemme an dem über die Kanüle gezogenen Gummischlauch aufgedreht und der Gummischlauch mitsamt der Kanüle und dem Herzen vom ausgezogenen Ende des Zylinderrohres *T* heruntergestreift, an die Waschvorrichtung geschlossen und das Herz wie vor Beginn des Versuchs mit der körperwarmen Tyrodelösung durchströmt, und zwar so lange, bis inzwischen die verbrauchte Lösung im Apparat durch eine neue ersetzt ist. Zu letzterem Behufe wird über das untere Ende von *T*, von wo wir soeben den Gummischlauch mit der Kanüle und dem Herzen herabgestreift haben, ein längerer Gummischlauch gezogen, dessen freies Ende, beim Seitenfenster der Wanne herausgeführt, in einen Meßzylinder hineinhängt, Glashähne *c* und *f* werden geöffnet, die Saug- und Druckpumpe wird in Gang gesetzt, hierdurch der weitaus größte Teil der Speiseflüssigkeit in den Meßzylinder geschleudert und sein Volumen daselbst abgelesen. Hierbei ergibt sich aber jedesmal ein Mangel, indem 20 bis 30 ccm stets zurückbleiben. Dieser Rest muß bei der Berechnung des Analysenergebnisses der nächsten Periode wohl berücksichtigt werden, denn durch den Rest wird sowohl das Volumen, wie auch die Zusammensetzung der frisch eingefüllten Speiseflüssigkeit verändert. Das Einfüllen erfolgt genau so, wie am Versuchsbeginn, doch ist es zweckmäßig, mittels der Saug- und Druckpumpe die ganze Flüssigkeit einmal im Apparat herumzuführen, wodurch erreicht wird, daß der zurückgebliebene Schaum, von allen Stellen weggespült und wieder verflüssigt, sich mit der neu eingefüllten Flüssigkeit vermischt.

Abschluß der Versuche. Ist auch die letzte Periode abgeschlossen, so überzeugen wir uns jedesmal davon, ob die Kanüle richtig (vor den Semilunarklappen!) eingesetzt war, und ob Herzhöhlen und Aortenstumpf keine Blutreste enthielten. Nun pressen wir das Herz gut aus, trocknen es ab und bestimmen, da ja der Zuckerverbrauch auf die Gewichtseinheit reduziert werden soll, sein Gewicht. Hierbei ergibt sich aber dadurch ein sehr ansehnlicher Fehler, daß sich die Herzen stets mehr oder minder ödematös angeschwellt erweisen, man also nicht das wirkliche, sondern um ein um das Ödemwasser vermehrte Gewicht

bestimmt, das zudem auch aus dem Grunde nicht richtig sein kann, weil beim Lospräparieren des Herzens von seiner Umgebung wechselnde Mengen nicht kontraktiler Substanz (Stücke der großen Gefäße, außerdem auch variable Mengen von Fettgeweben) das Herzgewicht ändern. Um diesen Fehler tunlichst auszumerzen, legen wir das Herz auf etwa 2 Stunden in siedendes Wasser, das ganz wenig Essigsäure enthält. Aus dem so behandelten Herzen wird das Fett förmlich weggekocht und lassen sich die erwähnten nicht kontraktilen Elemente mit einer Pinzette vom übrigen Herzen loslösen. Letzteres wird nun bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und dann der Zuckerverbrauch auf die nahezu fettfreie, kontraktile Trockensubstanz bezogen werden.

Beispiel der Berechnung eines Versuchs. An Hand des nachfolgenden Beispiels wird die Berechnung des Zuckerverbrauchs in drei getrennten Perioden eines Versuchs unter Berücksichtigung der oben erwähnten, beim Wechsel im Apparat zurückbleibenden Flüssigkeitsrestes klar vor Augen geführt.

Weibliches Tier. Körpergewicht 1950 g. Herzgewicht am Ende des Versuchs im feuchten Zustande 10,1 g, Herztrockengewicht 1,128 g.

I. Periode.

Eingefüllt 125 ccm Tyrodelösung, enthaltend 0,196 Proz. Zucker	= 245	mg
Schluß dieser Periode 1 Stunde später, die Lösung enthält 0,142 Proz. Zucker	= 178	„
Zuckerverbrauch	= 67	mg
Zuckerverbrauch pro 1 Stunde und 1 g feuchtes Herzgewicht	= 6,6	„
Zuckerverbrauch pro 1 Stunde und 1 g Herztrockensubstanz	= 59	„

II. Periode.

Von der ersten Periode zurückgeblieben 28 ccm, enthaltend 0,142 Proz. Zucker; frisch eingefüllt 125 ccm, enthaltend 0,196 Proz., also in 28 + 125 = 153 ccm enthalten 40 + 245	= 285	mg
Schluß dieser Periode 1 Stunde später; in 153 ccm Lösung enthalten 0,135 Proz. Zucker	= 207	„
Zuckerverbrauch	= 78	mg
Zuckerverbrauch pro 1 Stunde und 1 g feuchtes Herzgewicht	= 7,7	„
Zuckerverbrauch pro 1 Stunde und 1 g Herztrockensubstanz	= 69	„

III. Periode.

Von der zweiten Periode zurückgeblieben 32 ccm, enthaltend 0,135 Proz. Zucker, frisch eingefüllt 125 ccm, enthaltend 0,196 Proz. Zucker, also in 32 + 125 = 157 ccm . . . . 43 + 245	=	288	mg
Schluß dieser Periode 1 Stunde später, 157 ccm enthalten 0,142 Proz. Zucker	=	223	,,
Zuckerverbrauch	=	65	mg
Zuckerverbrauch pro 1 Stunde und 1 g feuchtes Herzgewicht	=	6,4	,,
Zuckerverbrauch pro 1 Stunde und 1 g Herztrockensubstanz	=	58	,,

(Die Zuckerkonzentration bestimmen wir stets nach dem neueren *Bang*schen Mikroverfahren.)

Die Unkosten der zu obigen Versuchen nötigen Apparatur wurden aus den Mitteln bestritten, die dem Institute von der *Ella Sachs-Plotz*-Stiftung zur Verfügung gestellt wurden. Der Verwaltung der genannten Stiftung sei auch an dieser Stelle unser bester Dank ausgesprochen.

Zur Kenntnis des Mechanismus der Immunitätserscheinungen.

IV. Mitteilung:

Dialysierungsversuche.

Von

B. Sbarsky und **K. Nikolaeff.**

(Aus dem Biochemischen Institut des Kommissariats für Volksgesundheit in Moskau.)

(Eingegangen am 27. Januar 1927.)

Beim Studium des Einflusses von Aminosäuren auf die Wirkung des Diphtherietoxins konnten *Sbarsky* und *Subkowa* (1) feststellen. daß der Zusatz von Tyrosin das Toxin atoxisch macht. Die Einführung von Gemischen aus Toxin und kleinen Mengen Tyrosin wird von Meerschweinchen ohne jegliche Folgen ertragen. Erheblich schwächer wirkten Glykokoll und Alanin, während Leucin vollständig wirkungslos blieb. Da das Toxin ein Gemisch aus mehreren Substanzen von ungleicher toxischer Wirkung vorstellt, ist es von Interesse zu erforschen, wie die einzelnen Bestandteile des Toxins durch die Aminosäuren beeinflußt werden.

Wir verfügen leider über keine Methode, die die genaue Zerlegung des Toxins in seine verschiedenen Bestandteile ermöglichte, obschon die Versuche, eine solche Zerlegung durch mannigfache Verfahren, insbesondere durch fraktionierte Fällung, zu erzielen, recht zahlreich sind. Beim Studium des Toxins wurde wiederholt zu verschiedenen Zwecken die Dialyse verwendet.

Die ersten die Dialyse von Diphtherietoxin betreffenden Arbeiten datieren vom Ende des vorigen Jahrhunderts. als zum ersten Male versucht wurde, das Toxin in trockenem Zustande herzustellen. Die Dialyse wurde vorwiegend zur Reinigung der erhaltenen toxischen Niederschläge von Alkohol, Salzen usw. angewendet. So wurde 1889 von *Roux* und *Jersin* (2) die wässerige Lösung des durch Alkoholfällung erhaltenen Niederschlags durch Pergament dialysiert. Es wurde nachgewiesen, daß das Toxin durch die Membran hindurchgeht, denn durch die Injektion der Außenflüssigkeit wurden Kaninchen getötet. Zu abweichenden Ergebnissen gelangten *Brieger-Fraenkel* (3) und *Wassermann-Proskauer* (4), nach deren Anschauung das Toxin gewöhnlich nicht oder nur in ganz unbedeutendem Maße dialysiert. 1905 dialysierten *Calcar* (5) und *Röhmer* (6) Diphtherietoxin unter Druck.

Diese Autoren gelangten zu dem Ergebnis, daß das Toxin bei der Dialyse unter normalem Druck nicht durch die Membran hindurchgeht, bei Überdruck jedoch leicht durch die Membran dialysiert.

Dernby und *Walbum* (7) wiederholten 1923 die Versuche mit der Toxindialyse und bestätigten, daß bei passendem Druck etwa 30 Proz. des in einem Kollodiumsäckchen befindlichen Toxins hinausdialysieren. *Nélis* (8) nimmt an, daß das Diphtherietoxin in kleinen Mengen durch kolloidale Membranen dialysiert.

Wir griffen zur Dialyse in der Hoffnung, durch dieses Verfahren das Diphtherietoxin in zwei Anteile zu zerlegen, um die Wirkung der Aminosäuren sowohl auf das Dialysat wie auf den durch die Membran hindurchgetretenen Anteil untersuchen zu können. Als Dialysierhülsen verwendeten wir Kollodiumsäckchen, die durch dreimaliges Begießen weiter Reagenzgläschen mit Kollodiumlösung (*Kahlbaum*) hergestellt wurden. Die Säckchen, deren Durchmesser etwa 4 cm und deren Länge etwa 10 cm betrug, wurden an Glasröhrchen befestigt und an Stativen aufgehängt. Vor dem Gebrauch wurden die Hülsen 1 bis 24 Tage lang in mehrmals erneutem destillierten Wasser gewaschen.

Es wurde jedesmal dieselbe Menge Toxin (25 ccm) in die Säckchen gegossen, in den äußeren Becher kamen 400 ccm destilliertes Wasser. Sowohl das Toxin wie das äußere Wasser blieben während der ganzen Dauer des Versuchs von einer dünnen Schicht Toluol bedeckt. Die Dialyse dauerte 24 Stunden im Dunkeln und bei Zimmertemperatur. Es wurden im ganzen 15 Dialysen mit ein und demselben Toxin ausgeführt, dessen Dlm. 0,0053 ccm betrug. Nach Abschluß der Dialyse wurde die Flüssigkeitsmenge im Innern des Säckchens sowohl, als im Außenbecher gemessen. Die Hülse wurde innen und außen mit je 20 ccm destillierten Wassers gespült, die den betreffenden Flüssigkeiten zugesetzt wurden. Dann wurde der Gesamt- und Reststickstoff (Fällung durch Phosphorwolframsäure) nach *Kjeldahl* und der Aminostickstoff nach *van Slyke* im Ausgangstoxin, in der inneren und in der äußeren Dialyseflüssigkeit bestimmt. Die Toxizität der letzteren wurde durch Injektionen an Meerschweinchen ermittelt. Auf solche Weise erhielten wir ein Bild von der Verteilung des Stickstoffs des Toxins nach der Dialyse und erfuhren, wieviel Letaldosen die Innen- und die Außenflüssigkeit enthielt.

Die Wirkung der Aminosäuren untersuchten wir, indem wir in einem Teile der Versuche Glykokoll und Tyrosin zur Innen- und Außenflüssigkeit zusetzten, in anderen Versuchen aber die Aminosäuren mit dem Toxin vor der Dialyse vermischten. Auch in diesen Versuchen wurde, wie bei der einfachen Dialyse, der Stickstoffgehalt und die Zahl der Letaldosen bestimmt.

Die Ergebnisse aller Versuche sind summarisch in nachstehender Tabelle zusammengefaßt.



Nr.	In der Dialysierhülse	Flüssigkeitsmenge nach der Dialyse in ccm		Stickstoffgehalt der Flüssigkeiten in mg									Zahl der Toxineinheiten		
				Gesamtstickstoff			Reststickstoff			Aminostickstoff					
				in der Hülse		im Außenbecher nach d. Dialyse	in der Hülse		im Außenbecher nach d. Dialyse	in der Hülse		im Außenbecher nach d. Dialyse	in der Hülse		im Außenbecher nach d. Dialyse
		in der Hülse	im äußeren Becken	vor der Dialyse	nach der Dialyse		vor der Dialyse	nach der Dialyse		vor der Dialyse	nach der Dialyse		vor der Dialyse	nach der Dialyse	
1	Toxin	49	376	112,7	18,0	87,6	45,5	5,1	40,1	21,8	2,70	18,0	4716	2500	900
2	„	48	375	112,2	18,4	86,2	46,4	4,4	36,2	21,1	1,43	19,4	4716	2400	950
3	„	45	379	110,0	17,8	83,3	47,7	4,1	41,1	21,1	1,13	18,9	4716	2250	925
4	„	47	377	110,1	19,0	86,0	45,1	5,1	40,8	21,2	—	—	4716	2350	575
5	„	43	382	—	18,4	83,2	—	4,3	40,7	—	2,51	15,5	4716	2250	550
6	„	42,5	381	—	16,8	87,9	—	2,8	43,1	—	1,95	17,0	4716	1750	650
7	„	44	381	—	23,1	84,8	—	2,1	39,7	—	3,61	16,5	4716	2200	550
8	Toxin + Glykokoll (ca. 3 g)	41	384	303,5	36,2	252,8	—	14,4	203,8	—	15,6	174,3	4716	2500	550
9	Toxin	42	382,5	—	24,2	85,0	—	4,4	40,1	—	3,2	15,0	4716	1950	650
10	Toxin + Glykokoll (ca. 1 g)	41	384	—	35,8	248,9	—	21,3	212,0	—	15,9	171,1	4716	3300	650
11	„ + „ (ca. 3 g)	42	382,7	670,0	72,1	556,3	—	53,5	515,5	—	50,0	498,6	4716	3000	100
12	„ + „ (ca. 6 g)	43,8	380,5	—	105,0	808,9	—	88,4	779,6	—	86,2	779,8	4716	3400	100
13	„ + Tyrosin (ca. 2,5 g)	38,5	385	—	42,05	75,6	—	10,9	46,1	—	5,10	19,01	4716	2000	125
14	„ + „ (ca. 1 g)	44	378	—	36,0	73,0	—	8,63	43,5	—	3,43	20,3	4716	1600	150
15	„ + „ (ca. 1 g)	39	385	—	34,9	76,5	—	9,3	44,2	—	4,3	20,6	4716	2000	175

Wie aus der Tabelle ersichtlich, ist die Verteilung der stickstoffhaltigen Substanzen nach der Dialyse ungleichmäßig. Aus den ersten sieben Versuchen, bei denen reines Toxin der Dialyse unterworfen wurde, geht hervor, daß die binnen 24 Stunden zwischen dem äußeren Becher und dem Innern des Dialysators ausgetauschte Flüssigkeitsmenge in allen Versuchen fast die gleiche bleibt. Von dem Gesamtgehalt der 25 ccm Toxin an Stickstoff (durchschnittlich 111,2 mg) werden nach der Dialyse in der Hülse nur 17,5 Proz. (durchschnittlich 19,46 mg) wiedergefunden, während die Außenflüssigkeit 76,8 Proz. (durchschnittlich 85,5 mg) davon enthält. Der Reststickstoff verteilt sich auf folgende Weise. Von den durchschnittlichen 46,17 mg bleiben im Dialysator 8,7 Proz. zurück, und 87,0 Proz. gehen in die Außenflüssigkeit über. Vom Aminostickstoff finden wir nach der Dialyse etwa 80,2 Proz. in der Außenflüssigkeit und ungefähr 11 Proz. im Dialysator wieder. Die prozentuale Verteilung des Reststickstoffs und des Aminostickstoffs nach der Dialyse ergibt also fast die gleichen Werte, die aber nicht mit denen des Gesamtstickstoffs übereinstimmen. Wir sehen weiter, daß der Aminostickstoff nur einen Teil des gesamten Reststickstoffs ausmacht (etwa 46 Proz.). Es ist wohl möglich, daß mit der *van Slyke*schen Methode, bei der eine Anzahl von Aminosäuren nicht ihren ganzen Gehalt an Aminogruppen freigeben, aus diesem Grunde nur ein Teil des gesamten Reststickstoffs bestimmt wird, obwohl letzterer vielleicht ausschließlich aus Aminostickstoff besteht. Diese Vermutung ist um so wahrscheinlicher, als die Verteilung beider Stickstoffarten mehr oder minder parallel geht.

Gleichzeitig wurde die Zahl der Letaldosen ermittelt. Es wurde die Flüssigkeitsmenge bestimmt, die erforderlich war, um ein Meerschweinchen auf den vierten Tag nach der Injektion zu töten und daraus die Anzahl der Letaldosen in der inneren und der äußeren Flüssigkeit berechnet. Wie aus der Tabelle ersichtlich, enthielten die 25 ccm des in den Dialysator gebrachten Toxins 4716 Letaldosen. Nach der Dialyse betrug die Summe der Toxineinheiten in der Innen- und Außenflüssigkeit bloß 61,8 Proz. des Ausgangswerts. Es gingen folglich etwa 38 Proz. der Toxineinheiten bei der Dialyse verloren, ein Umstand, der auch von den eingangs zitierten Autoren, die mit der Toxindialyse arbeiteten, hervorgehoben wurde. Da das gealterte Toxin, mit dem wir experimentierten, an und für sich beim 24stündigen Stehenlassen bei Zimmertemperatur seine volle Toxizität behielt, so muß dieser Verlust bei der Dialyse der Adsorption von Toxin an der Oberfläche des Kollodiums der Dialysierhülse zugeschrieben werden.

Die Verteilung der erhalten gebliebenen 62 Proz. der Toxineinheiten verhält sich umgekehrt der Verteilung des Stickstoffs, namentlich sind im Innern des Dialysators etwa 47 Proz. der ursprünglichen Letaldosen

enthalten, während sich etwa 15 Proz. in der Außenflüssigkeit befinden. Die Hauptmenge des Stickstoffs ist hingegen, wie wir gesehen haben, in der Außenflüssigkeit enthalten.

In den weiteren Versuchen wurde die Dialyse unter denselben Bedingungen ausgeführt, zu dem Toxin wurde aber Glykokoll (in den Versuchen 8, 10, 11, 12) und Tyrosin (Versuche 13, 14, 15) zugesetzt, um ihren entgiftenden Einfluß auf das Diphtherietoxin zu untersuchen.

In den Versuchen von *Sbarsky* und *Subkowa* hatte der Zusatz von Glykokoll eine geringe Abnahme der Toxizität des Diphtherietoxins zur Folge, während das Tyrosin es vollständig entgiftete. Diese Wirkung wird von *Sbarsky* dadurch erklärt, daß die Aminosäuren durch die Erythrocyten adsorbiert werden und sie auf diese Weise verhindern, das Toxin zu adsorbieren. Die Aminosäuren könnten in vitro chemisch auf gewisse toxische Anteile des Toxins einwirken und das Gemisch bei der Injektion bereits in entgiftetem Zustande in den Organismus gelangen. Diese Annahme konnte auf folgende Weise geprüft werden. Bei der Dialyse des Toxin-Aminosäuregemisches müssen die letzteren durch das Kollodiumsäckchen größtenteils in die Außenflüssigkeit übergehen. Ihre Wirkung könnte hier an der Verringerung der Zahl der Toxineinheiten kenntlich werden. Die Eigenschaften des im Dialysator zurückbleibenden Toxinanteils würden dabei unverändert bleiben. Sollte es sich um eine rein chemische Wirkung der Aminosäure in vitro handeln, so müßte ihr Einfluß auch in der Innenflüssigkeit zur Geltung gelangen, mit der sie ziemlich lange in Berührung bleiben. Die Dialyse dauerte 24 Stunden, während das Toxin-Aminosäurengemisch in den Versuchen von *Sbarsky* und *Subkowa* 15 Minuten nach der Herstellung injiziert wurde und sich bereits als atoxisch erwies. Bei der Betrachtung der Resultate der Dialyseversuche mit Toxin-Aminosäuregemischen ist ersichtlich, daß der als Aminosäure zugesetzte Stickstoff, wie zu erwarten war, fast vollständig in die Außenflüssigkeit überging. Im Versuch 10 wurden z. B. von den 192 mg Stickstoff, die dem zugesetzten Glykokoll entsprachen, 164 mg in der Außenflüssigkeit wiedergefunden. Der Aminostickstoffwert ergibt die gleiche Zunahme des Stickstoffgehalts der Außenflüssigkeit. Der größte Teil des Glykokolls war also in die Außenflüssigkeit übergetreten. Wenden wir uns zu den bei der Bestimmung der Letaldosen in der Außen- und Innenflüssigkeit bei den Dialyseversuchen mit Glykokoll erhaltenen Werten, so können wir uns überzeugen, daß in der Innenflüssigkeit nicht nur keine Abnahme des Gehalts an Toxineinheiten im Vergleich zum Kontrollversuch (Dialyse von reinem Toxin) stattgefunden hat, sondern umgekehrt, eine Zunahme erfolgt ist. In der Tat erhielten wir bei der Dialyse reinen Toxins in der Innenflüssigkeit stets durchschnittlich 2206 Toxineinheiten. In den Versuchen 10, 11

und 12 betrug der Toxingehalt der Innenflüssigkeit nach der Dialyse 3025 Einheiten. Diese Zunahme ist dadurch zu erklären, daß kleine Mengen von Glykokoll nicht nur keine Abnahme der Toxizität des Toxins hervorrufen, sondern im Gegenteil, seine Wirksamkeit erhöhen. Auf diese Erscheinung weisen *Sbarsky* und *Subkowa* in ihrer Arbeit hin. Ganz anders verhält sich die Außenflüssigkeit, in die die Hauptmenge des zugesetzten Glykokolls übergetreten ist. Bei den Versuchen mit 1 g Glykokoll enthielt die Außenflüssigkeit ebensoviel Letaldosen wie bei den Versuchen mit reinem Toxin. Wurden jedoch 3 oder 6 g Glykokoll zugesetzt (Versuche 11 und 12), so ergab sich bereits eine Abnahme des Toxingehalts von 650 Einheiten auf 100 Einheiten.

Dieselben Erwägungen gelten in vollem Maße für die Versuche 13. 14 und 15 mit Tyrosinzusatz. Nur wurde hier keine Zunahme des Toxingehalts der Innenflüssigkeit im Vergleich zur Kontrolle beobachtet. Dies stimmt vollständig damit überein, daß kleine Tyrosinmengen keine dem Glykokoll entsprechende Steigerung der Toxizität des Diphtherietoxins hervorrufen.

Diese Ergebnisse sprechen zugunsten der Anschauung, daß der Zusatz von Aminosäuren nicht auf chemische Weise die Eigenschaften des Toxins beeinflußt, sondern seine Wirkung in vivo bei der gleichzeitigen Einführung in den Organismus entfaltet.

Es war von Interesse, das Schicksal der 38 Proz. bei der Dialyse verloren gehenden Toxineinheiten zu verfolgen. Wir haben darauf hingewiesen, daß eine Reihe von Autoren diese Erscheinung dadurch zu erklären suchen, daß der Dialysator einen beträchtlichen Anteil des Toxins adsorbiere. Wir haben diese Annahme geprüft. Zu diesem Zwecke wurde das Kollodiumsäckchen nach der Dialyse innen und außen mit destilliertem Wasser gewaschen, alsdann in der Reibeschale mit physiologischer Kochsalzlösung zerrieben und die so erhaltene Emulsion Meerschweinchen subkutan injiziert. Die Meerschweinchen gingen ein, was darauf hinweist, daß tatsächlich Adsorption des Toxins erfolgt.

Zusammenfassung.

1. Bei der Dialyse des Diphtherietoxins geht dieses zum Teil in die Außenflüssigkeit über.

2. Die stickstoffhaltigen Anteile des Toxins verteilen sich nach der Dialyse auf solche Weise, daß die überwiegende Menge in der Außenflüssigkeit enthalten ist.

3. Dieser Stickstoff entfällt vorwiegend auf die Aminoprodukte des Toxins, deswegen tritt seine Wirkung in der Außenflüssigkeit deutlich zum Vorschein. Deshalb erscheint die Anzahl der Toxineinheiten in der Außenflüssigkeit beträchtlich erniedrigt.



4. Der Zusatz von Glykokoll und Tyrosin zum Diphtherietoxin wirkt nur auf die Außenflüssigkeit. Dies stimmt damit überein, daß der größte Teil der Aminosäuren bei der Dialyse in die Außenflüssigkeit übertritt.

5. Diese Resultate weisen darauf hin, daß der Einfluß der Aminosäuren auf das Diphtherietoxin nicht auf einer chemischen Wechselwirkung mit dem Toxin beruht, sondern in einer Schutzwirkung im Innern des Organismus besteht.

Literatur.

1) *Sbarsky-Subkowa*, diese Zeitschr. **172**, 40, 1926. — 2) *Roux-Yersin*, Ann. de l'Inst. Pasteur 1889. — 3) *Brieger-Fraenkel*, Berl. klin. Wochenschr. 1890. — 4) *Wassermann-Proskauer*, Deutsch. med. Wochenschr. 1891. — 5) *Calcar*, Berl. klin. Wochenschr. 1904. — 6) *Römer*, ebendaselbst 1905. — 7) *Dernby-Walbum*, diese Zeitschr. **138**, 505, 1923. — 8) *Nelis*, Ann. de l'Inst. Pasteur 1926.

Katalase und Peroxydase beim Epileptiker.

Von

Ilse Sachs und Herbert Zander.

(Aus dem Laboratorium der Anstalt Berlin-Wuhlgarten.)

(Eingegangen am 30. Januar 1927.)

Daß bei Epileptikern eine Stoffwechselstörung vorhanden ist, steht wohl seit den grundlegenden Versuchen von *de Crinis* und anderen Forschern einwandfrei fest. Unsere Untersuchungen galten der Frage, ob diese Störung auf eine mangelhafte Wirksamkeit der Oxydationsfermente zurückzuführen ist. Wir untersuchten zu diesem Zwecke die Katalase und die Peroxydase, denen bekanntlich eine Rolle im Stoffwechsel zugeschrieben wird, und verglichen in einer Reihe von Messungen die Wirksamkeit dieser Fermente bei genuinen Epileptikern und bei Gesunden.

A. Katalase.

Zur Bestimmung der Katalase wurde nach den Angaben von *Bach* und *Subkowa*[1]) verfahren, deren Arbeitsweise wir hier kurz wiedergeben:

Von einer 1 : 1000 verdünnten Blutlösung werden für jede Bestimmung drei Proben von je 1 ccm entnommen. Von diesen dient die erste zur Bestimmung des zur Verwendung gelangenden Wasserstoffsuperoxyds (2 ccm von 1 bis 1,5 Proz.); sie wird deshalb zwecks Zerstörung der Fermente aufgekocht und mit n/10 Kaliumpermanganatlösung titriert. Die zweite Probe dient zur Bestimmung der Katalase. Sie wird, nachdem sie 1 Stunde bei 17° gehalten wurde, mit der gleichen Menge Wasserstoffsuperoxyd versetzt. Nach einer halbstündigen Einwirkung titriert man das unzersetzte Wasserstoffsuperoxyd mit n/10 Kaliumpermanganatlösung, die Anzahl der zersetzten Kubikzentimeter n/10 Wasserstoffsuperoxyd mit 1,7 multipliziert ergibt die Katalasezahl. Diese wird also ausgedrückt durch die Menge Wasserstoffsuperoxyd in Milligrammen, die von 1 cmm Blut zersetzt wird. Die dritte nach *Bach* und *Subkowa* entnommene Probe dient zur Bestimmung der Protease.

Die Blutproben wurden im allgemeinen in Abständen von 1 bis 2 Tagen entnommen, einige Male auch in größeren Zwischenräumen. Von jeder

---

[1]) Diese Zeitschr. 125, 283, 1921.

Blutprobe wurden zwei Analysen ausgeführt und das arithmetische Mittel berechnet. Die Abnahme geschah morgens nüchtern oder mehrere Stunden nach der Mahlzeit.

Die im einzelnen gefundenen Werte waren folgende:

I. Bei Epileptischen:

Fall 1	9,9	11,1	11,9	11,4	11,2	10,9	13,9	13,9	12,2	10,5	13,3	12,1	—	—	—	—
„ 2	11,2	13,3	14,1	11,9	9,9	16,3	15,5	12,4	12,2	15,6	14,1	—	—	—	—	—
„ 3	12,1	15,1	13,8	13,3	14,6	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
„ 4	12,2	13,8	14,3	14.8	17,2	16,8	13,9	12,8	15,3	13,4	14,8	15,7	14,8	12,9	14,1	13,1
„ 5	12,4	13,3	14,4	11,6	20,4	20,1	13,8	14,6	17,6	15,6	17,3	16,7	15,6	14,8	17,7	—
„ 6	19,0	15,3	13,6	16,0	19,7	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
„ 7	12,4	11,7	13,8	13,8	14,8	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
„ 8	15,6	12.4	15,8	16,7	13,4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

II. Bei Gesunden:

Fall 9 . . .	17,0	17,9	16,5	17,0	17,0	15,0	16,8	—	—
„ 10 . . .	15,3	14,1	14,3	15,1	14,8	17,0	18,0	17,0	16,0
„ 11 . . .	15,3	12,6	15,8	—	—	—	—	—	—
„ 12 . . .	17,0	16,5	16,7	16,2	16,8	—	—	—	—
„ 13 . . .	21,1	18,9	20,1	18,9	18,0	—	—	—	—

Wir ermittelten nun bei jedem Falle von der Reihe der gefundenen Analysenergebnisse erstens den Durchschnittswert sämtlicher Bestimmungen, zweitens das Maximum und drittens das Minimum. Das Ergebnis ist in folgender Tabelle zusammengestellt:

Katalasezahlen.

	Durchschnittswerte	Maximalwerte	Minimalwerte	Anzahl der Bestimmungen
		I. Bei Epileptischen		
Fall 1	11,9	13,9	9,9	12
„ 2	13,4	16,3	9,9	11
„ 3	13,8	15,1	12,1	5
„ 4	14,4	17,2	12,2	16
„ 5	15,8	20,4	11,6	16
„ 6	16,7	19,7	13,6	5
„ 7	13,3	14,8	11,7	5
„ 8	14.8	16,7	12,4	5
		II. Bei Gesunden		
Fall 9	16,7	17,9	15,0	7
„ 10	15,7	18,0	14.1	9
„ 11	14.6	15.8	12,6	3
„ 12	16.6	17.0	16,2	5
„ 13	19.4	21,1	18,0	5

Wir berechneten dann aus diesen Zahlen den Gesamtdurchschnittswert für sämtliche Epileptiker und für sämtliche Gesunde und fanden:

Durchschnittliche Katalasezahl für Epileptische . . 14,3
Durchschnittliche Katalasezahl für Gesunde . . . 16,6

Der Durchschnitt sämtlicher Maximalwerte für Epileptische ergab die Katalasezahl 16,8, für Gesunde die Katalasezahl 18,0. Als Durchschnitt der Minimalwerte wurde für Epileptische die Katalasezahl 11,7, für Gesunde die Katalasezahl 15,2 gefunden.

Wie aus diesen Zahlen hervorgeht, ist die Katalasezahl bei Gesunden durchschnittlich etwas höher. Bei den Minimalwerten ist dieser Unterschied besonders deutlich, die Maximalwerte der Epileptiker liegen dagegen ziemlich dicht bei denen der Gesunden. Ein gesetzmäßiger Einfluß des Befindens, der Art der Nahrung und des Wetters konnte nicht festgestellt werden. Außerdem wurde in Stichproben das Blut einer Anzahl anderer Epileptischer auf Katalase geprüft, die gefundenen Werte blieben jedoch alle im Rahmen der oben ermittelten.

Die Fermenttätigkeit wird bekanntlich durch anorganische und auch organische Substanzen beeinflußt. Es lag demnach die Möglichkeit vor, daß die etwa im Blute Epileptischer vorhandenen pathologischen Abbauprodukte auch eine hemmende Wirkung auf die Katalasetätigkeit ausüben. Aus diesem Grunde bestimmten wir zunächst den Einfluß von Guanidinsulfat, Alkohol, Acetaldehyd, Coffein und Xanthin. Guanidinsulfat wurde gewählt, weil nach einigen Autoren guanidinähnliche Verbindungen im Blute Epileptischer eine wesentliche Rolle bei der Erkrankung spielen. Der Einfluß von Alkohol wurde mit Rücksicht auf die Alkoholepilepsie geprüft und Acetaldehyd als Oxydationsprodukt von Alkohol. Coffein und Xanthin wurden wegen ihrer Beziehungen zur Puringruppe gewählt, die bekanntlich im Eiweißstoffwechsel eine Rolle spielt.

In der folgenden Tabelle stellen die unter a verzeichneten Werte die nach der gewöhnlichen Methode ermittelten Katalasezahlen in reiner wässeriger Lösung dar, unter b sind die Katalasezahlen angegeben, die dasselbe Blut aufweist, wenn es an Stelle von destilliertem Wasser mit einer Lösung der betreffenden Substanz versetzt wird, so daß eine Konzentration von 1 : 100000 entsteht; ebenso unter c bei Verdünnung mit einer Lösung von 1 : 10000; unter d bei Verdünnung mit einer Lösung von 1 : 1000 und unter e bei Verdünnung mit einer Lösung von 1 : 100. Verwendet wurde hierbei stets Blut von Gesunden.

Aus der Tabelle geht hervor, daß die Einwirkung von Coffein in den angewandten Konzentrationen nur geringfügig ist. Guanidinsulfat zeigt jedoch schon in geringen Konzentrationen eine deutlich hemmende Wirkung, ebenso Acetaldehyd, der bei stärkeren Konzentrationen eine fast vollständige Lähmung der Fermenttätigkeit herbeiführt. Bei Zusatz von Alkohol ist die Aktivierung in der Konzentration 1 : 100000 auffallend. Aus den Ergebnissen geht hervor, daß Fremdstoffe außerordentliche Einwirkungen ausüben können, die selbst bei geringen Konzentrationen über die Fehlergrenze hinausgehen.

Änderungen der Wirksamkeit der Katalase im Blute bei Einwirkung steigender Menge fremder Stoffe.

	a	b	c	d	e
Guanidinsulfat:					
Fall 1	20,1	19,6	18,7	15,6	13,8
„ 2	16,0	14,6	13,8	12,8	11,7
Äthylalkohol:					
Fall 3	16,5	17,0	15,4	14,6	13,3
„ 4	18,0	19,4	17,9	17,3	13,6
Acetaldehyd:					
Fall 5	18,0	17,3	16,3	10,2	2,0
„ 6	20,4	20,1	17,9	13,8	4,9
Coffein:					
Fall 7	17,3	17,3	17,0	16,7	16,5
„ 8	19,0	19,2	19,2	19,0	18,7
Xanthin:					
Fall 9	19,0	19,0	18,7 *)	17,0 **)	—
„ 10	17,3	17,2	15,3 *)	14,1 **)	—

*) 1 : 50000. — **) 1 : 10000.

Um bei den analytischen Bestimmungen der Katalase dieser eine ähnliche Umgebung wie im Körper zu bieten, haben wir in einer weiteren Versuchsreihe zur Verdünnung des zu untersuchenden Bluttropfens kein Wasser, sondern Serum verwendet. Es wurden zwei Versuchsreihen ausgeführt, die erste unter Zusatz von Serum Gesunder, die zweite unter Zusatz von Serum Epileptischer. Wir untersuchten auf diese Art sowohl Blut von Gesunden wie auch Blut von Epileptischen.

Bei der Verwendung des Epileptikerserums leitete uns besonders der Gedanke, daß die unter Umständen in demselben vorhandenen pathologischen Stoffwechselprodukte bei der üblichen Analysenmethode durch das zugesetzte Wasser so stark verdünnt werden, daß ihre möglicherweise im Körper vorhandene lähmende Wirkung gänzlich aufgehoben wird, und daß wir nach dieser Methode Werte bekommen, die den tatsächlichen, im Körper vorhandenen Verhältnissen nicht entsprechen. Zu diesem Zwecke wurden 0,025 ccm Blut, das wie gewöhnlich aus der Fingerbeere genommen wurde, mit fremdem Serum auf 1 ccm verdünnt und hiervon für jede Bestimmung 0,02 ccm entnommen, die wiederum mit Serum auf 2,5 ccm verdünnt wurden. Wir hatten dadurch eine Verdünnung von 1 : 5000 erreicht gegenüber einer Verdünnung von 1 : 10000 bei den vorhergehenden Versuchen. Wasserstoffsuperoxyd wurde in möglichst konzentrierter Form hinzugegeben, für die Reaktion genügten 0,1 bis 0,2 ccm 30proz. Wasserstoffsuperoxyd.

Die in der folgenden Tabelle unter a verzeichneten Werte stellen die Katalasezahlen dar, die wir bei der Verdünnung von 1: 5000 mit Serum von Gesunden fanden. Unter b sind die Katalasezahlen angegeben, die wir bei der gleichen Verdünnung mit Serum von Epileptischen fanden. Außerdem wurde im Serummilieu der Einfluß von Guanidinsulfat auf die Katalasetätigkeit bestimmt, und zwar wurde der zu untersuchenden Lösung so viel Guanidinsulfat zugesetzt, daß eine Lösung 1: 10000 entstand. Das hierbei verwendete Serum stammte von Gesunden, die ermittelten Werte sind unter c angegeben. Es wurde nur Blut von Gesunden untersucht.

Katalasezahlen im Serummilieu.

	a	b	c
	Blut von Gesunden		
Fall 1 . . .	18,3 (24,1)	18,0 (24,0)	17,9 (23,8)
„ 2 . . .	16,3 (21,1)	16,3 (23,1)	16,2 (23,0)
	Blut von Epileptischen		
Fall 3 . . .	16,0 (22,8)	16,0 (22,8)	—
„ 4 . . .	17,0 (22,8)	16,2 (22,1)	—

Die in Klammern gesetzten Zahlen sind die Werte, die bei der direkten Berechnung der gefundenen Analysenresultate ermittelt wurden. Diese geben aber von der Katalasetätigkeit kein richtiges Bild, da auch das Serum selbst Wasserstoffsuperoxyd zersetzt. Wenn diese Zersetzung auch gegenüber der durch das Blut selbst verursachten nur minimal ist, so macht sie sich hier, wo wir die 5000fache Menge Serum verwendet haben, doch bemerkbar. Die nicht eingeklammerten Werte sind unter Berücksichtigung dieser Wirkung des Serums errechnet.

Die von uns erhaltenen Resultate lassen, wie aus der Tabelle ersichtlich ist, weder bei Blut von Gesunden noch bei Blut von Epileptischen einen Unterschied in der Katalasetätigkeit bei Gegenwart von Serum Gesunder gegenüber der bei Gegenwart von Serum Epileptischer erkennen, und dies dürfte wohl darauf hinweisen, daß eine nachteilige Einwirkung der im Blute Epileptischer vorhandenen pathologischen Abbauprodukte auf die Katalasetätigkeit nicht in Betracht kommt.

Die unter c angegebenen Werte lassen erkennen, daß Guanidinsulfat in der von uns verwendeten Konzentration keinen Einfluß auf die Katalasetätigkeit ausübt. Zum Vergleich stellten wir auch in den beiden ersten Fällen den Abfall der Katalasetätigkeit in wässerigen Lösungen durch die gleichen Mengen Guanidinsulfat fest, und wir fanden bei sonst unveränderten Bedingungen eine Herabsetzung um

über 20 Proz. Die bekannte Pufferwirkung des Serums tritt also auch dem Guanidinsulfat gegenüber in Erscheinung, und es läßt sich demnach vermuten, daß dies, besonders wenn man zugleich die Ergebnisse der Versuchsreihe b betrachtet, wohl auch gegenüber den pathologischen Stoffwechselprodukten im Blute Epileptischer geschieht.

Beim Vergleich der Katalasezahlen im Serum mit den in wässerigen Lösungen erhaltenen Werten fanden wir, selbst wenn wir die Wasserstoffsuperoxyd zersetzende Wirkung des Serums berücksichtigten, in einigen Fällen eine starke Aktivierung durch das Serum, in anderen Fällen nicht. Da wir diese Versuche nicht weiter ausdehnen konnten, können wir über die Ursache dieser Erscheinung oder über gesetzmäßige Zusammenhänge nichts aussagen.

Der Methode von *Bach* und *Subkowa* folgend, bestimmten wir in einer Anzahl von Fällen neben der Katalase auch die Protease. Aus den gefundenen Ergebnissen lassen sich jedoch keine Rückschlüsse ziehen.

B. Peroxydase.

Da die von *Bach* und *Subkowa*[1]) für Bestimmungen von Peroxydase im Blute mitgeteilte Methode auf kolorimetrischer Grundlage unseren Ansprüchen nicht genügte, arbeiteten wir zusammen mit *F. Ehrmann* die von *Smirnow*[2]) zur Bestimmung der Pflanzenperoxydase angegebene Methode für unsere Zwecke, Bestimmung der Blutperoxydase, weiter aus.

Nach *Smirnow* wird peroxydasehaltiger Pflanzenextrakt mit 1proz. Wasserstoffsuperoxyd- und Pyrogallollösung versetzt; nach Ablauf von 20 Stunden wird das durch Oxydation des Pyrogallols entstandene Purpurogallin in heißer schwefelsaurer Lösung mit einer abgemessenen, überschüssigen Menge n/10 Kaliumpermanganatlösung oxydiert und das nicht verbrauchte Kaliumpermanganat mit n/10 Oxalsäure titrimetrisch bestimmt. Nach *Smirnow* entspricht 1 ccm des verbrauchten n/10 Kaliumpermanganats 0,7 mg Purpurogallin. Das gebildete Purpurogallin gibt einen Maßstab für die Wirksamkeit der Peroxydase.

Diese Methode war für uns aus dem Grunde nicht ohne weiteres brauchbar, da, wie wir beobachtet hatten, auch gekochte Blutlösung nach Zusatz von Pyrogallollösung einen Niederschlag gibt, der durch Permanganatlösung oxydierbar ist. Da Peroxydase aber durch Kochen völlig zerstört wird, kann der Niederschlag kein Purpurogallin darstellen, er muß deshalb notwendigerweise zu falschen Analysenresultaten führen.

Wir sahen uns daher gezwungen, die *Smirnow*sche Methode für unsere Zwecke wie folgt abzuändern:

---

[1]) Diese Zeitschr. **125**, 283, 1921.
[2]) Ebendaselbst **155**, 1, 1925.

Von einer 1 : 200 verdünnten Blutlösung wurden für jede Bestimmung 3 ccm in ein Zentrifugiergläschen gebracht und mit 1 ccm 10proz. Pyrogallollösung versetzt. Der entstandene Niederschlag wurde abgeschleudert und mit kaltem Wasser ausgewaschen. Die nunmehr vom Niederschlag befreite Lösung, zu der auch das Waschwasser gegeben wurde, wurde jetzt mit 2 ccm 3proz. Wasserstoffsuperoxyd versetzt. Eine geringere Menge hiervon reicht in diesem Falle nicht aus, da die Wasserstoffsuperoxyd zersetzende Wirkung der Katalase in der vorliegenden Konzentration recht erheblich ist. Nach längerem Stehen (etwa 20 Stunden) wurde das gebildete Purpurogallin abgeschleudert, mit kaltem Wasser gewaschen, in heißer, etwa 80proz. Schwefelsäure gelöst und mit n/20 Kaliumpermanganatlösung titriert. Es wurde darauf geachtet, daß bei der Reaktion des Ferments auf Wasserstoffsuperoxyd stets die gleiche Verdünnung zur Anwendung kam. Purpurogallin konnte in dem durch Pyrogallol verursachten Niederschlag nicht mit entfernt werden, da ja Wasserstoffsuperoxyd erst später zugesetzt wird und ohne dasselbe Purpurogallin sich nicht bilden kann. Durch die beschriebene Methode wird natürlich nur die in den roten Blutkörperchen erhaltene, in Lösung gehende Peroxydase erfaßt.

Die Brauchbarkeit der Methode ergibt folgender Versuch: In einer aus Meerrettich hergestellten Peroxydaselösung wurde die Wirksamkeit des Ferments zuerst gravimetrisch, dann nach beschriebener Methode bestimmt. Die gefundenen Werte stimmten genügend genau überein. Gewichtsanalytisch wurde gefunden: 1 ccm der Lösung enthält 27,6 mg Purpurogallin. maßanalytisch wurden nach der von uns ausgearbeiteten Methode in 1 ccm 27,02 mg gefunden.

Für unsere Methode gilt das gleiche wie für die anderen Methoden zur Bestimmung der Blutfermente, man erhält nicht direkte Werte, sondern nur relative Zahlen[1]). Als Maßstab wurde die aus Wasserstoffsuperoxyd und Pyrogallol bei Gegenwart von 100 cm in Blut gebildete Menge Purpurogallin genommen. Bei einer Anzahl von Peroxydasebestimmungen nach der neuen Methode erhielten wir folgende Ergebnisse:

I. Bei Epileptischen:

Fall 1	11,2	13,3	8,9	11,0	—	—	—	—	—	—
„ 2	11,9	14,7	13,5	8,6	—	—	—	—	—	—
„ 3	9,1	11,0	6,5	11,9	12,8	15,4	14,9	15,2	14,0	14.2
„ 4	7,2	6,5	8,4	13,5	14.5	15.6	13,1	13,5	12,4	—
„ 5	10,3	6,3	6,3	9,1	9,8	—	—	—	—	—
„ 6	10,5	13,3	7,5	7,7	13,1	—	—	—	—	—

II. Bei Gesunden:

Fall 7	10,4	13,6	—	—	—	—	—	—	—	—
„ 8	11,2	13,5	15,6	16,6	16,6	16,4	14,7	—	—	—
„ 9	11,9	13,1	13,5	12,8	13,3	—	—	—	—	—
„ 10	13,1	12,8	11,9	11,0	10,3	—	—	—	—	—

[1]) Wieweit überschüssige Mengen Wasserstoffsuperoxyd und Pyrogallol eingewirkt haben, haben wir nicht untersucht.

Wie wir bereits bei den Katalasezahlen ausgeführt haben, ermittelten wir auch hier für jeden Fall den Durchschnittswert, das Maximum und das Minimum. Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht über unsere Zusammenstellung:

Peroxydase.

	Durchschnittswerte	Maximalwerte	Minimalwerte	Anzahl der Bestimmungen
		I. Bei Epileptischen		
Fall 1	11,1	13,3	8,9	4
„ 2	12,2	14,7	8,6	4
„ 3	12,5	15,4	6,5	10
„ 4	11,6	15,6	6,5	9
„ 5	8,4	10,3	6,3	5
„ 6	10,4	13,3	7,5	5
		II. Bei Gesunden		
Fall 7	12,0	13,6	10,4	2
„ 8	14,9	16,6	11,2	7
„ 9	12,9	13,5	11,9	5
„ 10	11,8	13,1	10,3	5

Aus diesen Zahlen errechnet sich ein Gesamtdurchschnitt für Epileptische von 11,0 gegenüber 12,9 für Gesunde, ein Durchschnitt der Maximalwerte für Epileptische von 13,5 gegenüber 14,2 für Gesunde und ein Durchschnitt der Minimalwerte für Epileptische von 7,4 gegenüber 11,0 für Gesunde.

Daraus geht hervor, daß der Gesamtdurchschnittswert für Epileptische gegenüber der Norm erniedrigt ist. Die Maximaldurchschnittswerte der Epileptiker und der Gesunden liegen nahe beieinander, die Differenz der Minimaldurchschnittswerte ist aber recht beträchtlich.

Gegenüber der Norm zeigt also die Peroxydasetätigkeit der Epileptiker ebenso wie die Katalasetätigkeit derselben erhebliche Schwankungen nach unten. Die Funktion der beiden Oxydationsfermente ist also zeitweilig gestört, ein beginnender Einfluß pathologischer Stoffwechselprodukte im Serum konnte nicht nachgewiesen werden.

Die Anwendung der Chinhydronelektrode zur Messung der Wasserstoffionenkonzentration in pufferarmen Lösungen.

Von

I. M. Kolthoff und Wouter Bosch.

(Aus dem Pharmazeutischen Laboratorium der Reichsuniversität Utrecht.)

(Eingegangen am 31. Januar 1927.)

Mit 1 Abbildung im Text.

Bei der Messung der Wasserstoffionenkonzentration in Lösungen, welche nur eine sehr geringe Pufferwirkung haben, fanden wir bei Anwendung der Chinhydronelektrode oft stark abweichende Werte, und zwar war das gefundene p_H immer kleiner als wir nach der Zusammensetzung erwarten konnten; die Abweichung nahm mit abnehmendem Puffergehalt stark zu. Weil die Bestimmung von p_H in pufferarmen Lösungen praktische Bedeutung hat (z. B. Bodenuntersuchung), haben wir uns die Aufgabe gestellt, die Abweichungen zu erklären und eine Vorschrift zu finden, nach der die Chinhydronelektrode auch in pufferarmen Lösungen zuverlässige Resultate gibt.

Zuerst haben wir verschiedene Chinhydronpräparate miteinander verglichen:

a) nach *Valeur*[1]) aus Hydrochinon und Chinon hergestellt (1) und (2),

b) wie a), aber aus Wasser umkristallisiert (1),

c) aus Hydrochinon und Ferriammoniakalaun nach *E. Biilmann*[2]) (1), (2) und (3),

d) wie c), einmal aus Wasser umkristallisiert,

e) wie d), zweimal aus Wasser umkristallisiert.

Es ergab sich in allen Fällen, daß die Umkristallisation aus Wasser einen ungünstigen Einfluß hat. Es scheint, daß die Zusammensetzung des Chinhydrons sich dabei ändert, wahrscheinlich ist die stark in die

---

[1]) *A. Valeur*, Ann. de Chim. et Phys. (7) **21**, **547**, **1900**.

[2]) *E. Biilmann* und *A. Lund*, Ann. de Chim. **16**, **321**, **1921**.



Komponenten Chinon und Hydrochinon gespaltene, gesättigte Lösung des Chinhydrons nicht im Gleichgewicht mit dem Bodenkörper. Zur Prüfung der Präparate haben wir zuerst die EMK der Chinhydronelektrode in dem Standardsalzsäuregemisch (0,01 n Salzsäure und 0,09 n Kaliumchlorid) gegen die Wasserstoffelektrode in demselben Gemisch bei 18⁰ gemessen. Nach den übereinstimmenden Werten in der Literatur beträgt die EMK dieser Kette bei 18⁰ 0,7042 ± 0,0002 Volt [bezogen auf Wasserstoff von 760 mm Druck[1])].

Alle Messungen sind im Thermostaten bei 18⁰ ± 0,1⁰ C ausgeführt. Wir haben verschiedene Arten von Wasserstoffelektroden verwendet; schließlich haben wir ein Gefäß benutzt, das in untenstehender Abbildung abgebildet ist. Wenn der Platinspiraldraht gut platiniert ist, ist die EMK innerhalb 2 bis 3 Minuten konstant. Natürlich haben wir uns immer überzeugt, daß auch nach längerem Durchleiten von Wasserstoff das Potential sich nicht mehr änderte.

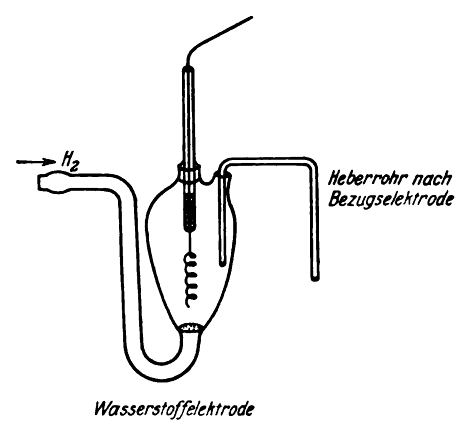


Abb. 1. Halbe Größe.

Die abgebildete neue Wasserstoffelektrode hat folgende Vorteile: 1. Das Potential stellt sich sehr schnell ein. 2. Sie verbraucht nur wenig Wasserstoff. 3. Das Modell ist auch geeignet, für das Arbeiten bei anderen Temperaturen. 4. Auch wenn der totale Elektrolytgehalt nur 0,001 n beträgt, ist die Ablesung mit einer geeigneten Apparatur noch auf 0,2 Millivolt genau. In allen Fällen, wo diese Wasserstoffelektrode angewandt werden kann, geben wir ihr den Vorzug über die Chinhydronelektrode. 5. Die benötigte Menge Flüssigkeit beträgt nur etwa 5 ccm. Zur schnellen Sättigung der platinierten Elektrode mit Wasserstoffgas ist der Glasboden, wo der Wasserstoff aus dem angeschmolzenen Rohr

[1]) Vgl. *Linderström-Lang*, C. r. du Lab. de Carlsberg **16**, Nr. 3, 1925.

in das Elektrodengefäß einperlt, perforiert. In dieser Weise wird der Wasserstoff in feinen Gasblasen verteilt.

Als Chinhydronelektrodengefäße verwendeten wir Röhren aus Jenaer Glas, welche mit einem Kautschukstopfen verschlossen sind. Der letztere trägt zwei Durchbohrungen, durch die eine steckt das Glasrohr, in dem unten ein Stückchen blankes Platinnetz eingeschmolzen ist, die andere trägt während des Messens das dünne Heberrohr — welches mit 3 Proz. Agar und 3,5 n bzw. 1,75 n KCl gefüllt ist — zur elektrolytischen Verbindung der Chinhydron- mit der Wasserstoffelektrode oder mit einer anderen Bezugselektrode.

Vor jedem Versuch wurde das Platinnetz gereinigt und ausgeglüht. Dann wurden etwa 10 ccm der zu untersuchenden Flüssigkeit in das Gefäß gegeben, 50 bis 100 mg Chinhydron hinzugefügt und 1 bis 2 Minuten kräftig geschüttelt. Darauf wurde die Elektrode eingesteckt und das ganze in den Thermostaten gestellt, bis die EMK konstant war. Gewöhnlich war das sehr schnell der Fall; in den sehr verdünnten Pufferlösungen änderte das Potential sich jedoch oft mit einem regelmäßigen Gang, so daß es unmöglich war, einen konstanten Wert zu erhalten. Zudem waren die Resultate nicht genau reproduzierbar. Wir kommen hierauf unten noch zurück.

Zur Kompensation verwendeten wir ein geeichtes „Studentspotentiometer“ von *Leeds* und *Northrop*. Die Ablesungen sind leicht auf 0,1 Millivolt reproduzierbar.

Als Bezugselektrode verwendeten wir gewöhnlich nach *Stig Veibel*[1]) eine Chinhydronelektrode in einer Lösung, die 0,01 n HCl und 0,09 n KCl enthielt (Standardsalzsäuregemisch). Das Gefäß wurde jeden Tag gereinigt und wieder von neuem mit der Elektrodenflüssigkeit und Chinhydron aufgefüllt. Zudem wurde die Elektrode ausgeglüht. Bei der Berechnung der p_H-Werte haben wir immer nach *Sörensen* angenommen, daß das p_H im Standardgemisch 2,038 gleich ist. Wahrscheinlich ist die entsprechende Aktivität der Wasserstoffionen kleiner als diesem p_H entspricht. Diese Sache hat für diese Untersuchung jedoch nur eine untergeordnete Bedeutung, weil wir die vergleichenden Messungen mit der Wasserstoffelektrode auf denselben Standardwert beziehen.

In der folgenden Tabelle geben wir die EMK der Chinhydronelektrode in Berührung mit verschiedenen Präparaten Chinhydron gegen die Wasserstoffelektrode. Beide Elektroden stehen im Standardsalzsäuregemisch. Die gefundenen Werte sind in der üblichen Weise für den Barometerstand und den Dampfdruck des Wassers korrigiert.

---

[1]) *Stig Veibel*, Journ. Chem. Soc. **123**, 2203, 1923.



EMK π. Chinhydron- und Wasserstoffelektrode im Standardsalzsäuregemisch bei 18°.

	π	p_H
a) Chinhydron aus Chinon + Hydrochinon (1)	0,7039	2,040
(2)	**0,7088**	2,038
b) Wie a), einmal aus Wasser umkristallisiert	0,7034	2,031
c) Chinhydron aus Hydrochinon und Ferriammoniakalaun Präparat (1)	**0,7088**	2,038
„ (2)	0,7042	2,045
„ (3)	0,7049	2,057
d) Wie c) (1), einmal aus Wasser umkristallisiert . . .	0,7033	2,030
e) „ c) (2), „ „ „ „ . . .	0,7023	2,012
f) „ c) (1), zweimal „ „ „ . . .	0,6688	1,428

Aus dem Obenstehenden ergibt sich, daß Chinhydron[1]), welches aus seinen Komponenten hergestellt ist (a), und Präparate, welche durch Oxydation von Hydrochinon mit Ferriammoniakalaun (c) erhalten wurden, in dem Standardsalzsäuregemisch dasselbe Potential aufweisen. Umkristallisation aus Wasser hat einen ungünstigen Einfluß, das Chinhydron weist dann eine zu saure Reaktion auf. Nach der zweiten Umkristallisation aus Wasser war das Präparat ganz unbrauchbar geworden. Wir haben diese Zubereitung nicht weiter analysiert[2]).

Bei den folgenden Untersuchungen haben wir immer Präparate verwendet, welche nach (a) und nach (c) hergestellt waren. Das Chinhydron, das aus seinen Komponenten hergestellt ist, kristallisiert gewöhnlich in dunkelgoldglänzenden, nadelförmigen Kristallen aus, während die Präparate, welche durch Oxydation des Hydrochinons bereitet sind, gewöhnlich viel dunkler aussehen und nicht so großkristallinisch sind. Läßt man die Kristallisation jedoch sehr langsam vor sich gehen, so gelingt es auch nach der Oxydationsmethode, größere und heller gefärbte Kristalle zu erhalten.

Bei den folgenden Versuchen haben wir die p_H verschiedener Pufferlösungen bei zunehmender Verdünnung sowohl mit der Wasserstoff- wie mit der Chinhydronelektrode gemessen. Obgleich wir viele Präparate Chinhydron benutzt haben, geben wir in den folgenden Tabellen nur kurz die Mittelwerte, welche mit Präparaten nach (a) und (c) erhalten sind. In den Fällen, wo die Chinhydronelektrode

[1]) Nach *Valeur*, Ann. de Chim. et Phys. (7) **21**, 547, 1900.

[2]) Wir bemerken hier, daß neuerdings *Th. Arndt* und *W. Siemers*, Zeitschrift f. Pflanzenernährung und Düngung **7**, 191, 1926, vgl. auch Chem. Centralbl. **1926**, II, 1080, für die Messung pufferarmer Flüssigkeiten empfehlen, zur Reinigung das Chinhydron zweimal aus Wasser von 70° umzukristallisieren. Wie wir gesehen haben, besteht dabei aber die Möglichkeit, daß das Chinhydron sich zersetzt, und es ist nötig, mit einer Standardlösung sich davon zu überzeugen, ob das Präparat noch zuverlässige Resultate ergibt.

noch gute Werte aufweist, geben die verschiedenen Zubereitungen auch die gleichen Resultate, bei sehr großen Verdünnungen wurden jedoch bei den Präparaten nach c erhebliche Differenzen wahrgenommen.

Messungen im Monokaliumcitrat.

Konzentration der Salze	p_H mit Wasserstoffelektrode	p_H mit Chinhydronelektrode a	c
0,25 molar	3,59	—	3,63
0,1 „	3,67	—	3,68
0,05 „	3,73	3,72	3,70
0,01 „	3,83	3,84	3,70
0,005 „	3,87	3,88	3,75
0,002 „	3,91	3,90	3,84
0,001 „	3,96	3,94	3,86

Das Wasser, welches bei den Verdünnungen verwendet ist, hatte bei 18⁰ eine spezifische Leitfähigkeit von 0,9 bis $1,2 \cdot 10^{-6}$ reziproken Ohms und war in Gleichgewicht mit der Luft ($1,5 \cdot 10^{-5}$ molar an Kohlensäure).

Die Werte, welche mit Präparaten nach (a) erhalten wurden, sind besser in Übereinstimmung mit denen, welche die Wasserstoffelektrode aufweist, als die, welche mit Zubereitungen nach (c) gemessen sind. Im letzteren Falle sind die Werte auch noch zuverlässig, wenn die Konzentration des Monocitrats größer als 0,01 mol. ist.

Kaliumbiphthalat.

Konzentration des Salzes	p_H mit Wasserstoffelektrode	p_H mit Chinhydronelektrode a	c
0,1 molar	3,918	—	3,905
0,05 „	3,969	—	3,942
0,01 „	4,013	4,00	3,987
0,005 „	4,059	4,08	3,994
0,002 „	4,216	4,20	3,895
0,001 „	4,311	4,33 (nicht konst.)	3,808

Hier weisen Präparate nach (c) bei sehr großen Verdünnungen eine zu saure Reaktion auf, und zwar steigt der Fehler stark mit der Verdünnung. Bei Konzentrationen kleiner als 0,005 n ist diese Chinhydronelektrode nicht mehr zuverlässig. Mit Präparaten nach (a) hergestellt, ist das Resultat viel besser: bei sehr großen Verdünnungen (0,001 mol. Lösungen) ist es aber schwer, konstante Resultate zu erhalten.

Nehmen wir Pufferlösungen, welche stärker alkalisch sind als die oben benutzten, so wird die Abweichung bei großen Verdünnungen noch größer. In den folgenden Tabellen geben wir davon einige Beispiele.

Gemisch von Monokalium- und -dicitrat.

Konzentration des Gemisches	p_H mit Wasserstoffelektrode	p_H mit Chinhydronelektrode	
		a	c
0,1 molar	4,76	4,74	4,71
0,05 „	4,88	4,89	4,85
0,01 „	5,00	5,01	4,95
0,005 „	5,09	5,12	4,92
0,002 „	5,17	5,20	4,79 (nicht konst.)
0,001 „	5,20	5,21	4,09 (nicht konst.)

Hier gibt also das Chinhydron nach (a) bei allen Verdünnungen zuverlässige Resultate, bei Präparaten nach (c) wird die Abweichung sehr groß, wenn die totale Citratkonzentration kleiner als 0,01 n wird.

Biphthalat-Natronlaugegemisch nach *W. M. Clark.*

50 ccm 0,1 mol. Kaliumbiphthalat und 29,95 ccm 0,1 n NaOH mit Wasser bis 100 ccm.

Totale Konzentration	p_H mit Wasserstoffelektrode	p_H mit Chinhydronelektrode	
		a	c
0,08 molar (unverdünnt)	5,21	—	5,22
0,016 „	5,35	5,35	5,27
0,008 „	5,40	5,38	5,28
0,0032 „	5,46	5,44	5,33
0,0016 „	5,48	5,40	4,78

Kaliumbiphosphat mit Natronlauge nach *W. M. Clark.*

50 ccm 0,1 mol. Kaliumbiphosphat und 29,63 ccm 0,1 n NaOH mit Wasser bis 100 ccm.

Totale Konzentration	p_H mit Wasserstoffelektrode	p_H mit Chinhydronelektrode	
		a	c
0,08 molar (unverdünnt)	6,99.	6,97	6,98
0,04 „	7,06	7,05	7,03
0,016 „	7,14	7,14	7,08
0,008 „	7,17	7,16	6,79
0,004 „	7,18	7,13	—
0,0016 „	7,19	7,09	4,15

Aus allen Messungsreihen und noch vielen anderen, welche hier nicht erwähnt werden, ergibt sich, daß das Chinhydron, welches durch Oxydation des Hydrochinons mit Ferriammoniakalaun hergestellt ist, in Lösungen von sehr geringer Pufferkapazität eine viel zu saure Reaktion aufweist, die Abweichung nimmt mit abnehmender Wasserstoffionenkonzentration der Pufferlösung zu. Dazu kommt noch, daß

die Elektrode in diesen pufferarmen Lösungen sich sehr langsam einstellt; je länger man wartet, um so mehr ändert sich das Potential nach der sauren Seite. Auch nach dem Umschütteln findet man wieder andere Werte.

Nachdem unsere Arbeit schon abgeschlossen war, erschien eine Mitteilung von *A. J. Rabinowitsch* und *V. A. Kargin*[1]), welche die Neutralisationskurve verschiedener schwacher Säuren mit der Wasserstoff- und Chinhydronelektrode bestimmten. Auch sie fanden, daß die Chinhydronelektrode in wenig gepufferten Lösungen (besonders in der Nähe des Äquivalenzpunktes) eine zu saure Reaktion aufweist. Sie schreiben die Ursache der Diskrepanz zwischen Wasserstoff- und Chinhydronelektrode der sauren Funktion des Hydrochinons zu, die sich in neutralen und alkalischen — nicht genügend gepufferten — Lösungen äußert. Für neutrale und saure Flüssigkeiten kann diese Erklärung jedoch nicht zutreffen. Ist doch die erste Dissoziationskonstante des Hydrochinons nach *H. v. Euler* und *Bolin*[2]) gleich $1{,}1 \cdot 10^{-10}$. Betrachten wir nun eine gesättigte Lösung des Chinhydrons in Wasser. Nach den Untersuchungen von *F. S. Granger*[3]) beträgt die Löslichkeit des Chinhydrons bei 25° $1{,}78 \cdot 10^{-2}$ mol.; die Lösung ist fast vollständig in die Komponenten Chinon und Hydrochinon zerfallen, und zwar ist die Hydrochinonkonzentration ungefähr gleich $1{,}7 \cdot 10^{-2}$. Aus den genannten Daten berechnen wir, daß eine gesättigte Chinhydronlösung in Wasser eine Wasserstoffionenkonzentration von $1{,}4 \cdot 10^{-6}$ hat, entsprechend einem p_H von 5,85. Die Lösung hat also dasselbe p_H wie gutes Leitfähigkeitswasser, das in Gleichgewicht mit der Luft ist. Auch läßt sich berechnen, daß der Einfluß des sauren Charakters des Hydrochinons in den von uns verwendeten sehr verdünnten Pufferlösungen vernachlässigbar klein ist.

Daß übrigens die saure Funktion des Hydrochinons bei unseren Versuchen nicht für die Abweichungen verantwortlich zu machen ist, ergibt sich zwanglos aus den guten Resultaten, welche mit dem Chinhydron, das aus Chinon und Hydrochinon hergestellt war, erhalten wurden. Wir müssen dann wohl annehmen, daß die anderen Präparate, welche durch Oxydation des Hydrochinons mit Ferrialaun hergestellt waren, saure Verunreinigungen enthalten. (*Rabinowitsch* und *Kargin* bemerken, daß sie unter anderem auch ein käufliches Präparat ver-

---

[1]) *A. J. Rabinowitsch* und *V. A. Kargin*, Zeitschr. f. Elektrochem. **33**, 11, 1927

[2]) *H. v. Euler* und *Bolin*, Zeitschr. f. physikal. Chem. **71**, 71, 1909; vgl. auch *Sheppard*, Chem. Abstr. **15**, 2393, 1921, der K_1 gleich $1{,}75 \cdot 10^{-10}$ und K_2 gleich $4 \cdot 10^{-12}$ fand.

[3]) *F. S. Granger*, Oxidation and Reduction in organic Chemistry from the Standpoint of potential differences. Diss. New York 1920.



wendeten, das offenbar mit sauren Oxydationsprodukten verunreinigt war.) Experimentell konnte die Anwesenheit der sauren Oxydationsprodukte auch leicht nachgewiesen werden. Die gesättigten wässerigen Lösungen der Chinhydronpräparate, nach c hergestellt, reagieren alle viel zu sauer (p_H 3,5 bis 4!). Durch Auswaschen mit Wasser kann man die sauren Oxydationsprodukte entfernen. Wir haben vier verschiedene Zubereitungen des Chinhydrons (c) gleich vor den Versuchen wiederholt mit destilliertem Wasser ausgewaschen und darauf die Messungen mit den sehr verdünnten Pufferlösungen wiederholt. Die erhaltenen Resultate waren vollkommen mit denen der Wasserstoffelektrode und der Chinhydronelektrode (a) in Übereinstimmung. Auch kann man in folgender Weise verfahren: Man fügt zu etwa 10 ccm der zu untersuchenden Flüssigkeit etwa 250 mg des vorliegenden Chinhydrons, schüttelt stark, läßt absitzen und mißt. Dann wird die überstehende Flüssigkeit abgegossen (wo nötig, nach zentrifugieren), wieder frisch aufgefüllt und die ganze Manipulation wiederholt, bis das Potential zuletzt konstant bleibt. Auch in dieser Weise wurden vorzügliche Resultate erhalten; bequem ist die Methode jedoch nicht. *Doch können wir in allen Fällen, wo man in sehr pufferarmen Lösungen Messungen mit der Chinhydronelektrode ausführt, empfehlen, zu prüfen, ob nach dem Abschenken eine frisch zugegebene Menge Flüssigkeit das ursprünglich wahrgenommene Potential nicht ändert.*

Eigenartig ist es, daß die durch Oxydation des Hydrochinons erhaltenen Präparate Chinhydron auch nach dem sorgfältigen Auswaschen, beim Stehen wieder sauer werden. Wir haben die säurefrei gewaschenen Präparate in verschiedener Weise aufbewahrt: an der Luft, in Kalk- und Schwefelsäureexsikkatoren, auch über Phosphorpentoxyd in vacuo usw.; nach längerem Stehen wurden sie jedoch alle wieder sauer und mußten bei den Messungen in pufferarmen Lösungen zuvor wieder ausgewaschen werden. Es scheint, daß die Spur Eisen, das die Präparate enthalten, die Oxydation des Hydrochinons zu sauren Produkten beschleunigt. Gut ausgewaschene Produkte sind wohl während einer Woche brauchbar; nach längerem Stehen ist es jedoch zu empfehlen, das Auswaschen zu wiederholen. Die sauren Oxydationsprodukte stören nur, wenn das p_H der Lösung größer als 3,5 ist. Ist die Reaktion saurer als diesem p_H entspricht, so wird die Dissoziation der verunreinigenden Säuren so stark zurückgedrängt, daß sie nicht mehr stören. So haben wir mit verschiedenen Zubereitungen nach (c) das p_H in einer Mischung von 0,001 n Salzsäure und 0,009 n Kaliumchlorid bestimmt und immer Werte gefunden zwischen 2,96 und 2,99, während die Wasserstoffelektrode ein p_H von 3,00 auswies.

Wir haben auch versucht, mit den ausgewaschenen Präparaten nach c das p_H vom destillierten Wasser zu bestimmen. Obgleich wir

wiederholt das Wasser frisch auffüllten, ist es uns nicht gelungen, einen größeren Wert als p_H 5,45 zu erreichen, während das wahre p_H 5,7 war (kolorimetrisch und berechnet).

Chinhydronpräparate, welche nach *Valeur*[1]) aus Hydrochinon und Chinon erhalten wurden, lassen sich gut aufbewahren. Auch nach längerem Stehen werden sie fast nicht merkbar sauer. Für Messungen mit pufferarmen Lösungen sind derartige Präparate daher besonders zu empfehlen. Jedenfalls ist es auch hier sicher, nach dem Messen abzuschenken und eine frische Menge Flüssigkeit hinzuzugeben. zur Prüfung, ob das Potential sich nicht mehr ändert.

Daß man bei der Anwendung der Chinhydronelektrode in praktischen Fällen durch die verunreinigenden Säuren große Abweichungen finden kann, wenn der Puffergehalt sehr gering ist, haben wir unter anderem auch bei der Reaktionsbestimmung in Bodenextrakten wahrgenommen. Die Bestimmung von p_H im Boden ist eine schwere Aufgabe, bei der sich viele Schwierigkeiten vortun. Wir hoffen, darauf später zurückzukommen, wollen hier nur aus dem Zahlenmaterial ein Beispiel herausnehmen, an dem sich der Einfluß der Verunreinigungen im Chinhydron sehr prägnant demonstrieren läßt. Durch längeres Zusammenschütteln von 50 g eines Bodens mit 200 ccm Wasser wurde ein Extrakt hergestellt, in dem das p_H bestimmt wurde. Nach 15 Minuten Durchführens von Wasserstoff wurde mit der Wasserstoffelektrode ein Wert von 5,54 gefunden, nach 45 Minuten von 5,64.

Mit der Chinhydronelektrode sind wir in der Weise verfahren, daß wir den Extrakt mit einem Überschuß Chinhydron (c) während 2½ Minuten zusammenschüttelten, in den Thermostaten stellten und warteten, bis das Potential konstant war. Dann wurde abgeschenkt, frischer Extrakt zugegeben und die Manipulation wiederholt.

In dieser Weise fanden wir:

	p_H
Erste Aufgießung . . .	3,82
Zweite „ . . .	4,95
Dritte „ . . .	5,36
Vierte „ . . .	5,56
Fünfte „ . . .	5,56

Schließlich erreichten wir also praktisch denselben Wert, wie mit der Wasserstoffelektrode gefunden war (5,64). Arbeiteten wir mit Chinhydronpräparaten, nach *Valeur* hergestellt, so war die ursprüng-

[1]) *A. Valeur*, Ann. de Chim. et Phys. (7) **21**, 547, 1900. Man mischt alkoholische (95proz.) Lösungen von Chinon und Hydrochinon und verwendet dabei zweimal die theoretische Menge Hydrochinon.



liche Abweichung viel geringer als im oben beschriebenen Falle, doch auch hier war die Reaktion noch etwa um 0,3 p_H zu sauer. Nachdem die Lösung aufgefrischt war, wurde das richtige p_H gefunden.

Aus diesen und vielen anderen Beispielen ergibt sich sehr deutlich, daß man bei Anwendung von Chinhydronpräparaten, welche durch saure Oxydationsprodukte verunreinigt sind, in pufferarmen Lösungen ganz fehlerhafte p_H-Werte erhalten kann.

Zusammenfassung.

1. In Lösungen, welche eine nicht zu geringe Pufferkapazität haben, erhält man mit Chinhydronpräparaten, welche nach verschiedenen Vorschriften hergestellt sind, ausgezeichnete Resultate.

2. Wenn Chinhydron in der einfachen Weise mittels Oxydation des Hydrochinons mit Ferriammoniakalaun hergestellt und darauf säurefrei gewaschen wird, so oxydiert es sich bei längerem Aufbewahren unter Bildung von sauren Oxydationsprodukten ein wenig. Derartige Präparate weisen in pufferarmen Lösungen eine viel zu saure Reaktion auf. Wäscht man sie vor dem Versuch sorgfältig aus, oder gibt man nach jeder Messung nach dem Abgießen frische Lösung hinzu, bis das Potential sich nicht mehr ändert, so werden in allen Fällen bei p_H-Werten kleiner als 7 gute Resultate erhalten.

3. Chinhydron nach *Valeur* aus seinen Komponenten hergestellt, ist sehr gut haltbar und ist für Messungen mit pufferarmen Flüssigkeiten zu empfehlen. Für alle Sicherheit ist es auch hier zu empfehlen, nach der Messung die Flüssigkeit abzuschenken und zu prüfen, ob mit frischer Lösung dasselbe Potential gemessen wird.

Eine Korrektur für die neue Reihe Pufferlösungen.

Von

I. M. Kolthoff und J. J. Vleeschhouwer.

(Aus dem pharmazeutischen Laboratorium der Reichsuniversität Utrecht.)

(Eingegangen am 31. Januar 1927.)

Bei einer Untersuchung über das Gleichgewicht im System Citronensäure–Natronlauge–Wasser ergab sich, daß unglücklicherweise in unserer Veröffentlichung [1]) über die neue Reihe Pufferlösungen ein Fehler eingeschlichen ist, den wir hier korrigieren wollen. Als Standardsubstanz verwenden wir Kaliummonocitrat, das nach dem Trocknen bei 80° wasserfrei ist, was sich aus der Analyse ergab. In der Literatur steht angegeben, daß das Salz nicht hygroskopisch ist, und es ergab sich bei unseren Versuchen, daß es bei längerem Aufbewahren an der Luft *äußerlich* nicht geändert wird und trocken bleibt. Ein derartiges Salz war bei unseren Messungen verwendet, und leider hat sich jetzt ergeben, daß es 1 Mol Wasser angezogen hatte. Das Molargewicht des Salzes ist also 248 statt 230. Wir verwendeten damals eine 2,3proz. Lösung, während eine 0,1 mol. Lösung 2,48 g des Hydrats auf 100 ccm enthält.

Arbeitet man nun mit dem Salz, das 1 Mol Kristallwasser enthält, und geht man von einer 2,3proz. Lösung aus, so gelten alle Zahlen, wie sie ursprünglich angegeben waren; was wir später wiederholt bestätigt haben.

Geht man jedoch in Wirklichkeit von einer 0,1 *mol.* Monokaliumcitratlösung aus, dann sind die angegebenen Zahlen nicht vollkommen richtig mehr, und muß man untenstehende Tabelle benutzen. (Die Abweichungen von der ursprünglichen Tabelle sind nur verhältnismäßig klein, weil das Citratsystem so stark puffert.)

0,1 mol. Monokaliumcitrat mit 0,1 n Salzsäure. p_H 2,2 bis 3,8.

25 ccm Monocitrat	+ 24,85 ccm	0,1 n HCl	mit	Wasser	bis 50 ccm	p_H 2,2
	+ 21,70 „	0,1 n HCl	„	„	„ 50 „	p_H 2,4
	+ 18,40 „	0,1 n HCl	„	„	„ 50 „	p_H 2,6
	+ 15,10 „	0,1 n HCl	„	„	„ 50 „	p_H 2,8
	+ 11,80 „	0,1 n HCl	„	„	„ 50 „	p_H 3,0
	+ 8,6 „	0,1 n HCl	„	„	„ 50 „	p_H 3,2
	+ 5,35 „	0,1 n HCl	„	„	„ 50 „	p_H 3,4
	+ 2,10 „	0,1 n HCl	„	„	„ 50 „	p_H 3,6

[1]) *J. M. Kolthoff* und *J. J. Vleeschhouwer*, diese Zeitschr. **179**, 410, 1926.

0,1 mol. Monocitrat mit 0,1 n Natronlauge (p_H 3,8 bis 6,2).

25 ccm Monocitrat	+ 1,0 ccm 0,1 n NaOH	mit Wasser bis 50 ccm	p_H 3,8
	+ 4,50 „ 0,1 n NaOH	„ „ „ 50 „	p_H 4,0
	+ 8,15 „ 0,1 n NaOH	„ „ „ 50 „	p_H 4,2
	+ 11,85 „ 0,1 n NaOH	„ „ „ 50 „	p_H 4,4
	+ 15,75 „ 0,1 n NaOH	„ „ „ 50 „	p_H 4,6
	+ 19,60 „ 0,1 n NaOH	„ „ „ 50 „	p_H 4,8
	+ 23,35 „ 0,1 n NaOH	„ „ „ 50 „	p_H 5,0
	+ 27,1 „ 0,1 n NaOH		p_H 5,2
	+ 30,5 „ 0,1 n NaOH		p_H 5,4
	+ 34,0 „ 0,1 n NaOH		p_H 5,6
	+ 37,2 „ 0,1 n NaOH		p_H 5,8
	+ 40,6 „ 0,1 n NaOH		p_H 6,0

0,1 mol. Monocitrat mit 0,1 molarer Citronensäure (p_H 2,2 bis 3,8)

ccm 0,1 mol. Monocitrat	ccm 0,1 mol. Citronensäure	p_H
0,89	9,11	2,2
1,85	8,15	2,4
2,85	7,15	2,6
4,04	5,96	2,8
5,36	4,64	3,0
6,84	3,16	3,2
8,20	1,80	3,4
9,57	0,43	3,6

0,1 mol. Monocitrat mit 0,05 mol. Borax.

25 ccm Monocitrat	+ 0,65 ccm Borax	mit Wasser zu 50 ccm	p_H 3,8
	+ 4,4 „ „	„ „ „ 50 „	p_H 4,0
	+ 8,6 „ „	„ „ „ 50 „	p_H 4,2
	+ 13,5 „ „	„ „ „ 50 „	p_H 4,4
	+ 18,0 „ „	„ „ „ 50 „	p_H 4,6
	+ 22,8 „ „	„ „ „ 50 „	p_H 4,8
	+ 27,4 „ „		p_H 5,0
	+ 31,2 „ „		p_H 5,2
	+ 34,9 „ „		p_H 5,4
	+ 38,3 „ „		p_H 5,6
	+ 41,7 „ „		p_H 5,8
	+ 44,1 „ „		p_H 6,0

Zur teilweisen Entschuldigung des gemachten Fehlers sei hier angeführt, daß wir damals wohl Versuche über die Stabilität des anhydrischen Monokaliumcitrats angestellt haben. Es ergab sich, daß das Salz in einer Atmosphäre mit einem relativen Dampfdruck von 60 Proz. kein Wasser aufnahm. Daraus (und auch aus den Angaben in der Literatur) war die fehlerhafte Schlußfolgerung gezogen, daß das Monocitrat unter allen Verhältnissen luftstabil ist. Aus dem Obenstehenden ergibt sich jedoch, daß das Salz bei einem relativen Feuchtgehalt der Luft, der größer als 60 Proz. ist, Wasser anziehen kann. Diese Sache wird noch näher untersucht werden. Wir wollen hier schließlich nur bemerken, daß es nötig ist, das anhydrische Monokaliumcitrat in einer gut schließenden Flasche aufzubewahren.

Beitrag zur Kenntnis des Seidenleims.

Von

Nikolaus Alders.

(Aus der Abteilung für physiologische Chemie im Wiener physiologischen Universitätsinstitut.)

(Eingegangen am 1. Februar 1927.)

Im Verlauf einer zu anderem Zwecke in Angriff genommenen Untersuchung wurde eine größere Menge Seidenleims (Sericins) dargestellt. Da die chemischen Eigenschaften dieses Eiweißkörpers noch unvollkommen bekannt sind, wurde die Gelegenheit wahrgenommen, diesen Körper näher zu untersuchen.

Im folgenden sei die etwas modifizierte *Darstellungsmethode* des Sericins und die *allgemeinen Eigenschaften* desselben mitgeteilt, sowie die Resultate der *Tryptophan-*, *Tyrosin-*, *Cystin-* und *Arginin*bestimmung angegeben.

Darstellung.

Das *Prinzip* aller Darstellungsmethoden des Sericins besteht darin, daß Rohseide in Wasser gekocht und aus dem Dekokte der in Lösung gegangene Seidenleim in mehr oder minder gereinigtem Zustande gewonnen wird. (Es sei hierauf aufmerksam gemacht, daß das in Österreich als „Rohseide" käufliche Material schon „degummiert", d. h. vom Sericin befreit ist.)

Die älteste Darstellung des Sericins stammt wohl von *Mulder*[1]), der die durch Kochen von Rohseide erhaltene Sericinlösung auf dem Wasserbad bis zur Trockne eindampfte und den Rückstand mit Alkohol, Äther und heißem Wasser extrahierte. Die Methode *Cramers*[2]), der aus der wie oben gewonnenen Sericinlösung den Eiweißkörper mit basischem Bleiacetat fällt und nach Entfernung des Bleies als PbS das Sericin mit Alkohol niederschlägt, ist — abgesehen von ihrer Umständlichkeit — mit dem Nachteile verbunden, daß das Schwefelblei vom Eiweißkörper eingeschlossen wird und nur schwer entfernt werden kann. *Bondi*[3]) hat zwei Methoden der

---

[1]) *Mulder*, Poggendorfs Ann. f. Phys. u. Chem. **37**, 1837.
[2]) *Cramer*, Journ. f. prakt. Chem. **96**, 76 und 77, 1865.
[3]) *Bondi*, Zeitschr. f. phys. Chem. **34**, 481 bis 499., 1902.

Darstellung von Sericin aus *Kokons* der Seidenraupe Bombyx mori vorgeschlagen: Nach der *ersten*, die — wie der Autor selbst angibt — mit großen Verlusten verbunden ist, werden die von den Puppen befreiten Kokons nach Reinigung mit Wasser und Salzsäure in Wasser ausgekocht. Die Seidenleimlösung hinterläßt nach dem Abdampfen spröde Lamellen, die gepulvert, mit kaltem Wasser, Natronlauge, Essigsäure, kaltem und siedendem Alkohol, sowie mit Äther behandelt, in heißem Wasser gelöst und mit Alkohol gefällt werden. *Bondi* stellte so eine wasserlösliche und wasserunlösliche Modifikation des Sericins dar. Die *zweite*, weitaus einfachere Methode beruht darauf, daß im Dekokte der Kokons das Sericin mit 1proz. Essigsäure gefällt wird. Der Niederschlag wird durch häufiges Dekantieren mit Wasser ausgewaschen und dann mit Alkohol und Äther extrahiert. Diese — an sich einfache — Darstellungsmethode erschien uns darum nicht empfehlenswert, weil sich das Sericin nach der Fällung mit Essigsäure außerordentlich langsam absetzt. *Emil Fischer*[1]) erhielt Sericin einfach durch Eindampfen der durch Abkochen von Rohseide im Autoklaven gewonnenen Lösung. Auch *Türk*[2]) hielt sich an die eingangs erwähnte Methode *Mulders*. Kürzlich gaben *Shelton* und *Johnson*[3]) zwei Methoden zur Darstellung von Seidenleim an: Rohseide wird im Autoklaven mit wenig Wasser gekocht und das Sericin aus dem Dekokt entweder mit Alkohol oder mit Ammonsulfat niedergeschlagen. *Keizo Kodama*[4]) gibt eine Modifikation der zweiten Darstellungsmethode *Bondis* (l. c.) an.

Hier sei — nach Ausprobung der meisten eben erwähnten Methoden — folgender Vorgang zur Darstellung des Sericins empfohlen, der darauf verzichtet, die wasserunlösliche von der wasserlöslichen Form zu trennen, zumal die sonstigen chemischen Eigenschaften beider Modifikationen die gleichen sind.

Je 100 g Rohseide[5]) werden dreimal in je 3 Liter Wasser jedesmal etwa 2 Stunden lang *gekocht*, die Dekokte auf dem Wasserbad bis auf ungefähr ein Fünftel ihres Volumens *eingeengt* und im Dialysierschlauch 24 Stunden gegen fließendes Leitungswasser und 6 Stunden gegen destilliertes Wasser *dialysiert*, um die dem Eiweißkörper anhaftenden Aschenbestandteile wenigstens teilweise zu entfernen. Aus der Seidenleimlösung wird das Sericin durch Zusatz des doppelten Volumens 96proz. *Alkohols gefällt* und nach mehrstündigem Stehen abfiltriert. Der vom Filter genommene Niederschlag wird in etwa 80proz. Alkohol, welcher zweckmäßig durch Destillation aus dem ersten Filtrat gewonnen wird, kurz *aufgekocht* — wobei nach *Bondi* (l. c.) die anhaftenden *Farbstoffe* größtenteils in Lösung gehen —, nochmals filtriert und in Alkohol gekocht und schließlich auf dem Filter mit Äther nachgewaschen, über Schwefelsäure getrocknet und fein zerrieben.

---

[1]) *E. Fischer*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **39**, 155, 1908.

[2]) *Türk*, ebendaselbst **111**, 70 bis 75, 1920.

[3]) *Shelton* und *Johnson*, Journ. of Amer. Chem. Soc. **47**, 412 bis 418, 1925.

[4]) *Keizo Kodama*, The Biochem. Journ. **20**, Nr. 6, 1208, 1926.

[5]) Bezogen von der Firma Gebr. Schmid in Basel.

Allgemeine Eigenschaften.

Das so gewonnene Produkt ist ein *grauweißes Pulver*; es ist in Wasser und verdünnter Säure unlöslich, löst sich dagegen unter Aufquellen in verdünnter Natronlauge und mit brauner Farbe in konzentrierter Salzsäure in der Kälte langsam, bei Erwärmen schnell. Die *Biuret* und *Xanthoproteinreaktion* ist positiv, ebenso die Probe nach *Millon* und *Voisenet*; die Reaktion nach *Molisch* ist angedeutet; *Fehling*sche Lösung wird durch eine alkalische Serecinlösung *nicht reduziert.* Die *Aschenbestimmung* ergab $\begin{Bmatrix} 3{,}89 \\ 3{,}94 \end{Bmatrix}$ *3,9 Proz.*

Stickstoff im Sericin.

Die Stickstoffbestimmung nach *Kjeldahl* ergab einen *Gesamt-N-Gehalt* von $\begin{Bmatrix} 15{,}98 \\ 15{,}84 \end{Bmatrix}$ *15,9 Proz.*

Die *Verteilung* des Stickstoffs wurde nach *Osborne* und *Harris*[1]) bestimmt und wie folgt ermittelt.

Säureamid-N	$\begin{Bmatrix} 1{,}605 \\ 1{,}750 \end{Bmatrix}$	*1,68 Proz.*
N im Magnesiumniederschlage	$\begin{Bmatrix} 0{,}11 \\ 0{,}125 \end{Bmatrix}$	0,12 Proz.
Basen-N	$\begin{Bmatrix} 1{,}45 \\ 1{,}57 \end{Bmatrix}$	*1,51 Proz.*
Monoamino-N		*12,59 Proz.*

Tryptophanbestimmung.

Die einzige in der Literatur auffindbare Angabe über Tryptophan im Sericin ist die *Emil Fischers* (l. c.), der das Vorhandensein dieser Aminosäure im Seidenleim *qualitativ* nachwies.

Der Tryptophangehalt des Sericins wurde nach der Methode von *Fürth* und *Dische*[2]), welcher auf der *Voisenet*schen Farbreaktion beruht, mit $\begin{Bmatrix} 0{,}98 \\ 0{,}92 \end{Bmatrix}$ *1,0 Proz.* ermittelt.

Nach *Fürth* und *Lieben*[3]) ist für die Bildung der *Melanoidine* bei der Säurehydrolyse eines Eiweißkörpers in erster Linie der Tryptophangehalt des Proteins maßgebend. Mit Sericin angestellte Säurehydrolysen ergaben einen Melanoidingehalt von 1,6 Proz. mit einem N-Gehalt von 0,16 Proz., der — auf Tryptophan umgerechnet — 1,18 Proz. Tryptophan im Sericin entspräche (gefunden 1,0 Proz.); dieses Resultat steht mit den Ergebnissen der erwähnten Arbeit im Einklang.

---

[1]) *Osborne* und *Harris*, Chem. Centralbl. **1903, I, 1279.**
[2]) *O. Fürth* und *Z. Dische*, diese Zeitschr. **146, 275, 1924.**
[3]) *O. Fürth* und *F. Lieben*, ebendaselbst **116, 224, 1921.**

Tyrosinbestimmung.

Strauch[1]) findet 1 Proz., *Abderhalden* und *Warms*[2]) 2,3 Proz., *Türk* (l. c.) 5,96 Proz. Tyrosin im Sericin (ermittelt nach gravimetrischen Methoden).

Unsere nach der auf der *Millon*schen Reaktion basierenden Methode von *Fürth* und *Fischer*[3]) vorgenommene Bestimmung ergab einen Tyrosingehalt von $\left\{\begin{matrix}5{,}83\\6{,}20\end{matrix}\right\}$ *6,0 Proz.*

Um für die beiden vorerwähnten Bestimmungen eine Stütze zu gewinnen, wurde eine *Nitrierung* des Sericins vorgenommen, da ja *Lieben*[4]) für zahlreiche Proteine gezeigt hat, daß der quantitativ ermittelbare NO_2-Wert eines nitrierten Eiweißkörpers mit der Mononitrierung des in dem betreffenden Protein enthaltenen Tyrosins + Tryptophans in befriedigender Weise übereinstimmt.

Es wurde Sericin mit 20proz. Salpetersäure nitriert und (nach Behandlung des Produkts mit 1proz. Sodalösung) für 2 g Nitroprodukt *0,039 g* NO_2 gefunden, während die Berechnung, basierend auf den oben mitgeteilten Bestimmungen des Tyrosins und Tryptophans,

für Tyrosin 6 Proz.	0,030 g NO_2
für Tryptophan 1 Proz.	0,005 g NO_2
	0,035 g NO_2

ergibt.

Schwefel- (bzw. Cystin-) Bestimmung.

Über Schwefel- bzw. Cystinbestimmung im Sericin, ebenso wie über einen qualitativen Nachweis desselben ist *in der Literatur keine Angabe* zu finden.

Nach der alten Methode von *Liebig-Du Ménil* wurde in der Ätznatron-Salpeterschmelze des Sericins der Schwefel als $BaSO_4$ bestimmt und auf Cystin umgerechnet. Es ergibt sich so ein *Cystingehalt* des Seidenleims von $\left\{\begin{matrix}1{,}23\\1{,}19\end{matrix}\right\}$ *1,2 Proz.*

Argininbestimmung.

Türk (l. c.) fand nach der Methode von *Kutscher* und *Kossel* 4,56 Proz. Arginin in Seidenleim.

Wir bestimmten das Arginin im Sericin als Salz der Flaviansäure nach der Methode von *Kossel* und *Gross*[5]) und fanden $\left\{\begin{matrix}4{,}12\\4{,}46\end{matrix}\right\}$ *4,3 Proz.* Arginin in unserem Eiweißkörper.

---

[1]) *F. W. Strauch*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **71**, 365, 1911.
[2]) *Abderhalden* und *Worms*, ebendaselbst **62**, 142, 1909.
[3]) *O. Fürth* und *A. Fischer*, diese Zeitschr. **154**, 1, 1924.
[4]) *F. Lieben*, ebendaselbst **145**, 535, 1924.
[5]) *A. Kossel* und *E. Gross*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **135**, 167, 1924.

Histidin und Lysin.

Türk (l. c.) ermittelte den *Histidin*gehalt des Sericins mit 1,02, den *Lysin*gehalt mit 1,96 Proz. (nach der Methode von *Kutscher* und *Kossel*).

Unsere nach der von *Hanke* und *Koessler*[1]) angegebenen Methode ausgeführte Histidinbestimmung ergab ein negatives Resultat, so daß wir *für das Vorhandensein von Histidin* in dem von uns dargestellten Produkte *keinen Anhaltspunkt haben.*

Der Gehalt des Sericins an *Basen-N* beträgt, wie oben erwähnt, 1,51 Proz., der Gehalt an *Arginin-N* ergibt sich aus dem Gehalt an dieser Aminosäure mit 1,37 Proz.; da unser Eiweißkörper kein Histidin enthält, ist die Differenz

Basen-N	1,51 Proz.
— Arginin-N	1.37 „
	0,14 Proz.

dem *Lysin* zuzuschreiben. Einem Lysinstickstoffgehalt von 0.14 Proz. entspricht ein *Lysingehalt von 0,7 Proz.*

Relation der quantitativ bestimmten Aminosäuren im Sericinmolekül.

Man kann versuchen, aus den eben mitgeteilten Zahlen das *molekulare Verhältnis der einzelnen Aminosäuren zueinander im Verband des Sericinmoleküls* zu berechnen.

Wir stellten diese Berechnung in der allgemeinen üblichen Weise an und ermittelten folgende Relationen:

Tryptophan	1,02
Tyrosin	6,89
Cystin	1,04
Arginin	5,14
Lysin	1

oder abgerundet:

Tryptophan	1
Tyrosin	7
Cystin	1
Arginin	5
Lysin	1

[1]) *Milton T. Hanke* und *Karl K. Koessler*, Journ. of biol. Chem. **39**, 498, 1919; **43**, 527, 1920.

Beitrag zur Kenntnis der alkoholischen Hefegärung und deren Beschleunigung durch Tierkohle.

Von

H. Iveković.

(Aus dem Institut für allgemeine experimentelle Pathologie und Pharmakologie der Universität Zagreb.)

(Eingegangen am 1. Februar 1927.)

Mit 5 Abbildungen im Text.

Die günstige Beeinflussung der Kolloide und Adsorbenzien auf das Wachstum und die Lebenstätigkeit der Mikroorganismen ist eine wohlbekannte Tatsache. Die ersten Befunde auf diesem Gebiet stammen von *Neuberg*[1]), wobei seinen Untersuchungen statt Hefezellen deren Preßsaft zugrunde lag. In derselben Richtung sind auch die *Abderhalden*schen[2]) Versuche bezüglich der Gärungsbeschleunigung vermittelst Tierkohle von besonderer Bedeutung. Diesen Versuchen zufolge wird die alkoholische Gärung durch Zusatz der Kohle bedeutend aktiviert. Was die Ursache dieser Beschleunigung anbelangt, beruht dieselbe nach *Abderhalden* auf der Bildung von Acetaldehyd; für diesen hatte zuvor *Neuberg*[1]) eine stimulierende Wirkung nachgewiesen[3]), und *Abderhalden* hat ihn im kohlehaltigen Medium in erhöhter Konzentration gefunden.

Mit weiter unten zu besprechenden Versuchen war ich bestrebt, der von *Abderhalden* aufgeworfenen Frage insofern näherzutreten, da andererseits (z. B. von *Söhngen*) auch andere Faktoren in Betracht gezogen wurden. Es ist eben zu entscheiden, ist der von *Abderhalden* gefundene Acetaldehyd der alleinige Faktor der Gärungsbeschleunigung oder spielen noch andere Faktoren bei dieser Erscheinung mit. Meine Untersuchungen jedoch beziehen sich nicht allein auf die angeschnittene Fragestellung, sondern es wurden auch andere Erscheinungen bei der Gärungsbeschleunigung in Betracht gezogen.

---

[1]) *Neuberg*, diese Zeitschr. **88**, 145, 1918; *Neuberg, Reinfurth* und *Sandberg*, ebendaselbst **121**, 215, 1921.

[2]) *Abderhalden*, Fermentforschung **5**, 89, 110, 1921; **5**, 255, 273, 1922; **6**, 143, 149, 162, 1922; **6**, 345, 1923.

[3]) Diese Tatsache konnte ich auch bestätigen.

Ich experimentierte mit untergäriger Bierhefe, und in allen Versuchen war Tierkohle als Adsorbens verwendet. Hiermit stellte ich auch eine Serie Vor- oder Nebenversuche zusammen, die sich wie folgt dem Hauptthema anreihen.

Die Versuchsanordnung selbst war nach folgender Voraussetzung gegeben:

Wenn einer Gärungsflüssigkeit, die Kohle enthält, solche Substanzen beigegeben werden, die hemmend wirken und dabei auch kapillaraktiv sind, so können deren schädliche Eigenschaften entfernt werden, indem diese Substanzen von der Kohle adsorbiert werden. Als stark kapillaraktive und dabei gärungshemmende Substanzen wurden verschiedene Urethane[1]) in 0,015 mol. Konzentration genommen.

Die so angestellten Versuche ergaben folgendes Resultat und wurden in folgender Weise ausgeführt:

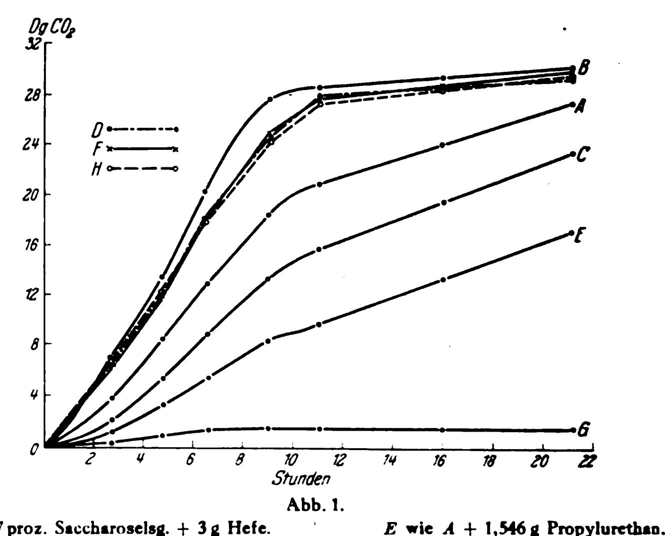


Abb. 1.

A 100 ccm 7proz. Saccharoselsg. + 3 g Hefe.
B wie *A* + 5 g Kohle.
C wie *A* + 1,335 g Äthylurethan.
D wie *C* + 5 g Kohle.
E wie *A* + 1,546 g Propylurethan.
F wie *E* + 5 g Kohle.
G wie *A* + 1,757 g Isobutylurethan.
H wie *G* + 5 g Kohle.

In acht Erlenmeyerkolben von je 150 ccm Inhalt kamen 100 ccm einer 7proz. Saccharoselösung hinein. Nach Zusatz bestimmter Mengen von verschiedenen Urethanen (0,015 mol.), Kohle (Carbo medic. *Merck* „Neu"), Hefe (immer dasselbe Präparat in allen Versuchen), wurden die Kolben mit Gärungsverschluß versehen und bei 25° C im Thermostaten der Gärung unterworfen und deren Verlauf durch Gewichtsverlust mit einer feinen Wage verfolgt. Die Resultate des Versuchs stellt die Abb. 1 dar.

[1]) *Warburg*, Ergebn. d. Physiol. **14**, 295.

Aus dem Diagramm ist ersichtlich, daß sich in unserer Versuchsanordnung bloß die mit Urethanen versetzten Gärungsproben nach der *Traubeschen Regel* verhalten (*C*, *E*, *G*), während dieselben durch Zusatz von Kohle (*D*, *F*, *H*) eine größere Gärungsintensität zeigen als die Kontrollprobe *A*, und dabei fallen sie nur etwas niedriger als der reine Kohlenversuch *B* aus. Zugleich fällt es auf, daß sich die *Kurven D*, *F* und *H* innerhalb der Versuchsfehler *decken*. Diese letztgenannte Erscheinung ist wohl eine Resultante aus mehreren Komponenten, von welchen wir beispielsweise die Einwirkung der in der Lösung verbliebenen Urethanmengen auf die Hefe und die Verdrängung des adsorbierten Zuckers von der Oberfläche hervorheben möchten. Da uns bei unseren Versuchen der Gewichtsverlust der Proben als ein Indikator der Gärungsbeschleunigung diente, war es jedenfalls von Interesse, zu erfahren, ob die Differenz der Gewichtsverluste mehr auf Kosten der CO_2-Verdrängung durch Kohle oder durch die stimulierende Einwirkung von gebildetem Acetaldehyd zu setzen wäre. Bei den *Abderhalden*schen Untersuchungen wurde der CO_2-Verdrängung durch Tierkohle keine Berücksichtigung zuteil. *Abderhalden* lag es hauptsächlich daran, die Gärungsbeschleunigung zu zeigen, ohne sich in quantitative Analyse der Beschleunigung einzulassen.

Es ist bekannt, daß die Gärungsflüssigkeit noch viel Kohlensäure enthält. Nachdem es von Wichtigkeit war, die Größe der Kohlensäureverdrängung durch Kohle kennenzulernen, wurden folgende Versuche unternommen:

In zwei Erlenmeyerkolben, *A* und *B*, von 150 ccm Inhalt kamen 100 ccm 7proz. Zuckerlösung. Dem Kolben *B* wurden noch 5 g Kohle zugefügt, schließlich kamen in beide Kolben noch 5 g Hefe, worauf, mit einem Gärungsverschluß versehen, beide bei 19° C der Gärung unterworfen wurden. Verlauf der Gärung wurde durch Gewichtsverlust verfolgt. Nach einer bestimmten Zeit wurde Kolben *A* (Kontrolle) und gleichzeitig auch Kolben *B* gewogen. Nach Abnahme des Verschlusses kam in den Kontrollkolben *A* die gleiche Kohlenmenge, wie bereits in *B* vorhanden (5 g), worauf der Verschluß wieder daraufgesetzt und das ganze gut durchgeschüttelt wurde. Während des Schüttelns entwickelt sich eine große Menge von Kohlensäure, jedoch bleibt dasselbe Vorgehen in der Probe *B* ohne merklichen Einfluß. Zu vermeiden ist das Übergehen des sich entwickelnden Schaumes in den Verschluß. Nach Beendigung der Gasentwicklung wurde der Kolben neuerlich gewogen und das beigefügte Kohlengewicht davon in Abzug gebracht. *Die Differenz zwischen den Kolbengewichten nach der Beigabe von Kohle und Durchschüttelung* — abzüglich das Gewicht der Kohle — ergibt einen neuen Punkt *A'* des Diagramms. Auf diese Weise ist es möglich, eine ganze Kurve *A'* zu erhalten, wobei selbstverständlich für je zwei entsprechende Punkte der Ordinate bei Kurve *A* und *A'* derselbe Kolben zu nehmen ist.

Die auf angegebene Weise erhaltene Kurve *A'* stellt eine Gärungskurve dar, so wie sie auch die Gärung *B* ergeben würde, *wenn die Kohle*

nur ausschließlich eine verdrängende Wirkung entfalten würde, ohne dabei andere Folgen zu zeitigen. *Die Differenz zwischen B und A′ gibt die eigentliche Beförderung der Gärung durch Kohle an.* Die entsprechenden Versuche sind aus der Abb. 2 ersichtlich.

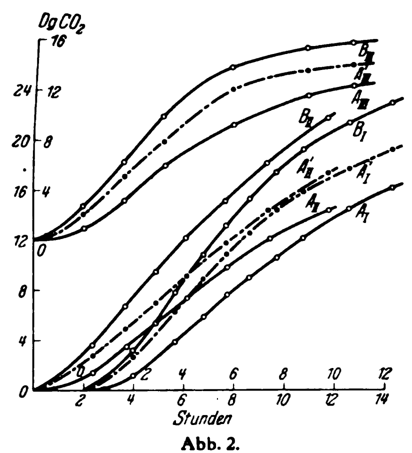


Abb. 2.
A 100 ccm 7proz. Zuckerlösung + 5 g Hefe. *B* wie *A* + 5 g Kohle.
I. Glucose. II. Lävulose. III. Saccharose.

Aus den Diagrammen geht hervor: 1. daß die Differenz der entwickelten Kohlensäure zwischen dem normalen Medium und jenem Kohle enthaltenden das Resultat *zweier Komponenten* ist; a) der faktischen Gärungsbeschleunigung, das heißt der rascheren Zuckervergärung, und b) der durch Kohle verdrängten Kohlensäure; 2. daß die Gärungsflüssigkeit noch viel Kohlensäure enthält, die sich nach Zusatz von Kohle größtenteils verdrängen läßt. Demnach fördert Kohle die Verdrängung der Kohlensäure aus der gärenden Flüssigkeit. Die Menge des verdrängten CO_2 ist nicht gering. Sie beträgt etwa 40 bis 50 Proz. der gesamten Beschleunigung, die wir vermittelst Gewichtsverlustmethode erhalten haben (d. h. $B - A$). Die *Abderhalden*schen Versuche zeigten demnach — quantitativ genommen — viel zu hohe Resultate, denn es ist klar, daß man unter Gärungsbeschleunigung nicht die Differenz zwischen der im Kontrollversuch und der im eigentlichen Versuch mit Kohle entwickelten Kohlensäure zu verstehen hat, sondern die Differenz an zersetztem Zucker zwischen den erwähnten Versuchen. Die Differenz $B - A'$ gibt diese Menge, ausgedrückt in CO_2, d. h. die Differenz in Zucker ist etwa die doppelte. Daraus können wir den Schluß ziehen, daß die übliche Methode der Gärungsverfolgung vermittelst Gewichtsverlust auf die Gärungsbeschleunigung durch Kohle und andere Adsorbenzien nicht anwendbar ist, denn es könnte vorkommen, daß z. B. bei einer gewissen Konzentration einer gärungshemmenden Substanz im Medium mit Kohle eine größere CO_2-Entwicklung stattfinden könnte als in Kontrolle ohne diese Substanzen, und doch könnte die Gärungsgeschwindigkeit im ersten Falle kleiner sein.

Die genannte Methode ist nur dann zulässig, wenn man die quantitativen Verhältnisse zweier Gärungen, sei es *mit* oder *ohne* Kohle, untereinander vergleicht, keinesfalls aber darf man dieselbe auf zwei verschiedene Gärungen anwenden.

Den Mechanismus der Kohlensäureverdrängung aus der Gärungsflüssigkeit können wir auf folgende Weise deuten: In der Flüssigkeit befindet sich das Kohlendioxyd in Form seiner Säure H_2CO_3 und gelöst, d. h. in molekularem Zustande mit hydrierten Wassermolekülen, die wir in der Form $CO_2 . n H_2O$ schreiben können. Das hydrierte Molekül $CO_2 . n H_2O$ (dasselbe gilt auch für die H_2CO_3) wird von der Kohle adsorbiert, an deren Oberfläche sich folgende Reaktion abspielt: $CO_2 . n H_2O \rightarrow CO_2 + n H_2O$, d. h. das hydrierte Molekül CO_2 zerfällt in Wasser und CO_2, welch letztere in gasförmigem Zustande entweicht, da sie von der Kohlenoberfläche durch das umgebende Wasser verdrängt wird. Auf diese Weise setzt sich der Prozeß weiter fort. Neue Mengen von $CO_2 . n H_2O$ werden auf der Kohlenoberfläche adsorbiert, auf welcher das Gleichgewicht zwischen der adsorbierten und nicht adsorbierten Kohlensäure immerfort gestört wird[1]). Die Erklärung hat natürlich nur unter der Voraussetzung Gültigkeit, daß die Reaktionsgeschwindigkeit $CO_2 . n H_2O \rightarrow CO_2 + n . H_2O$ wie auch die Verdrängung des CO_2 durch Wasser groß und daher die CO_2-Konzentration auf der Oberfläche gering ist.

Wie oben erwähnt, gibt hiermit die übliche Methode der Gärungsbeschleunigung mit Kohle zu hohe Resultate, weshalb versucht wurde, eine exaktere zu finden, die genauer die eigentliche Differenz des vergorenen Zuckers angeben würde. Diese Absicht ist leicht erreichbar, da sich das Medium mit dem Kohlezusatz gut filtrieren läßt und ein polarisierbares Filtrat ergibt.

Aus diesen Gründen wurden die Versuche auf folgende Weise unternommen: Wenn man die erwähnte Zuckerdifferenz unserer Gärungen bestimmen will, so durchschüttelt man zu bestimmter Zeit beide Kolben *A* und *B*, und entnimmt jedem die gleiche Menge (z. B. 20 ccm). *B* (Versuch mit Kohle) wird direkt ohne weiteres durch ein nasses quantitatives Filter filtriert, während der aus *A* genommenen Flüssigkeit diejenige Kohlenmenge beigefügt wird, die aus *B* entnommener Flüssigkeitsmenge entspricht, gut durchschüttelt und filtriert. Danach läßt sich auch das Medium von *A* klar filtrieren. *A* und *B* werden immer *gleichzeitig* filtriert, um nachher polarisiert zu werden. Die ganze Prozedur bis zur Erhaltung des Filtrats dauert bei einiger Übung nicht über 1 Minute. Beim Filtrieren waren die Verhältnisse in beiden Proben immer vollkommen gleich, und außerdem wurden die ersten Kubikzentimeter des Filtrats nicht verwendet. Wie hervorgeht, wird bei diesem Versuch die auf der Kohle adsorbierte Zuckermenge nicht berücksichtigt, sondern nur die in der Lösung verbliebene. Ganz natürlich wurde die Lösung aufgekocht, um die Mutarotation des Zuckers bei späterer Beobachtung zu eliminieren.

Die auf diese Weise erhaltenen Resultate lassen nicht die gesamte in einem der Medien enthaltene Zuckermenge erkennen, sondern nur

---

[1]) Die beschleunigte Gärung in den rauhen Gefäßen der Gärungsindustrie ist auf dasselbe Prinzip zurückzuführen.

die *Differenz zwischen den vergorenen Zuckern*, was uns bereits die obengenannte Gärungsbeschleunigung darstellt.

Es möge an dieser Stelle eine Bemerkung bezüglich der Genauigkeit der erwähnten Methode eingeschaltet werden. Dieselbe ist nämlich keine vollkommen exakte, denn es vergärt *B* schneller, d. h. es verringert schneller die Zuckerkonzentration. Nachdem die Adsorption von der Konzentration abhängt und nachdem mit geringerer Konzentration die Menge des adsorbierten Zuckers absolut genommen abnimmt, so wird die Flüssigkeit *B* im Polarimeter eine größere Ablenkung aufweisen als wenn aus *B* die gleiche Zuckermenge wie aus *A* adsorbiert werden würde. Außerdem entwickelt sich in *B* etwas mehr Alkohol, was zur Folge hat, daß von der Kohlenoberfläche etwas mehr Zucker in die Flüssigkeit eluiert wird als in der Probe *A*, wodurch auch die Differenz der Konzentrationen etwas vermindert wird, d. h. die auf

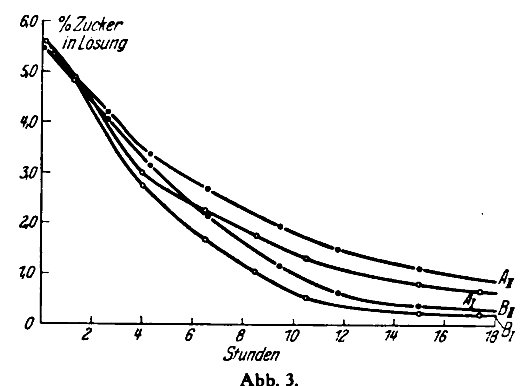


Abb. 3.
A 200 ccm 7proz. Zuckerlösung (gekocht) + 10 g Hefe. *B* wie *A* + 10 g Kohle.
I. Glucose. II. Lävulose.

angegebene Weise erhaltenen Resultate werden etwas *zu klein* ausfallen. Wie daraus hervorgeht, ist obengenannte Methode zwar nicht exakt, jedoch sind die durch dieselbe verursachten Fehler nicht zu groß, weshalb sie auch bedeutend genauere Resultate zeigt als die Gewichtsverlustmethode allein, was auch nachfolgende Resultate illustrieren.

Zwei 300-ccm-Erlenmeyerkolben *A* und *B* enthalten je 200 ccm 7proz. Zuckerlösung, worauf Kolben *B* 10 g Kohle zugesetzt wurden. In beide Kolben kamen darauf 10 g Hefe und schließlich wurden beide bei 19° C der Gärung unterworfen. Von Zeit zu Zeit wurde *A* durchgeschüttelt, der Flüssigkeit mit einem Meßzylinder 20 ccm entnommen und dieser Menge 1 g Kohle zugefügt, worauf durchgeschüttelt, filtriert und polarimetriert wurde. Es wurden 10 ccm des Filtrats verwendet. Polarimeter nach *Landolt-Lippich*. Aus der in *B* enthaltenen Flüssigkeit wurden *zu gleicher Zeit* ebenfalls 20 ccm entnommen und desgleichen filtriert und polarimetriert. Die Resultate sind aus der Abb. 3 ersichtlich.

Inwiefern diese Resultate mit denjenigen einerseits durch Verdrängung des CO_2 durch Kohle erhaltenen (S. 453) und andererseits durch Gewichtsverlust — unter sonst streng gleichen Gärungsbedingungen — übereinstimmen, erweist Abb. 4.

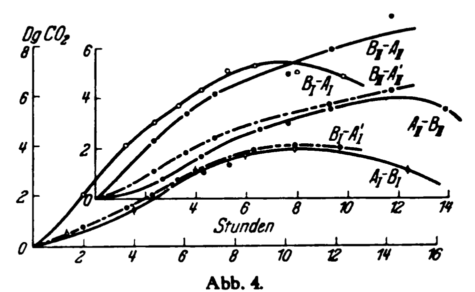


Abb. 4.
$B - A$ aus der Abb. 2. $B - A'$ aus der Abb. 2.
$A - B$ aus der Abb. 3.
I. Glucose. II. Lävulose.

Wenn wir bloß die Differenz der Gärungsintensitäten verfolgen wollen, so ist man imstande, auf diese Weise den Verlauf der Gärung zweier gewöhnlicher Gärungsflüssigkeiten zu verfolgen, d. h. von welchen beide keine Kohle enthalten.

Dann wird bei beiden Gärungen analog wie oben bei Gärung A vorgegangen. Die zugefügte Kohlenmenge in einem Teile der entnommenen Gärungsflüssigkeit soll so klein als möglich sein.

Da ein analoger Versuch mit Saccharose infolge der stattfindenden störenden Inversion nicht anstellbar ist, so wurde der Versuch so ausgeführt, daß eine Mischung von Glucose zur Lävulose als 1 : 1 in derselben Gesamtkonzentration verwendet wurde. Einen so angestellten Versuch stellt die Abbildung 5 dar.

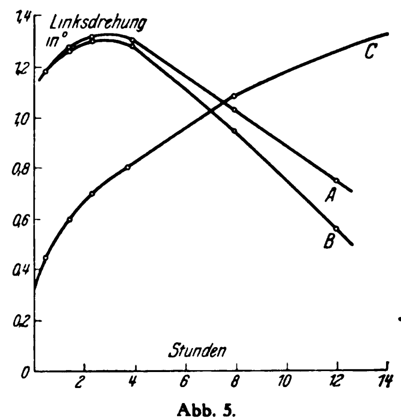


Abb. 5.
A 200 ccm 7 proz. Lösung der Glucose-Lävulosemischung 1 : 1 + 10 g Hefe.
B wie A + 5 g Kohle.
C 200 ccm 7 proz. Lösung der Glucose-Lävulosemischg. 1,78 : 1 + 10 g Hefe.
$T = 19^0$ C. $l = 100$ mm.

Aus dem Diagramm sieht man, daß bei Gärung dieser Mischung die Kurve der polarimetrischen Drehung ein flaches Maximum anzeigt, welches man auf die schnellere Vergärung der Glucose beziehen könnte. Es erscheint nämlich die Erklärung plausibel, daß die Glucose zur Lävulose während des erwähnten Maximums annähernd im Verhältnis ihrer polarimetrischen Drehung etwa $\frac{93,0}{52,5} = 1,78$ vergärt, d. h. daß auf ein Mol Lävulose beiläufig 1,78 Mol Glucose entfällt.

Daß im Diagramm die Kurven A und B nebeneinander verlaufen, bedeutet weiterhin, daß die Kohle auf das Gärungsverhältnis keinen Einfluß hat, weil sonst in vorliegendem Falle der Kurve B ein ganz anderer Verlauf vorstünde. Das Vergärungsverhältnis der Glucose

zur Lävulose hängt nämlich, wie bekannt, mit der Änderung des Konzentrationsverhältnisses 1 : 1 beider Zuckerarten zusammen. Nachdem die Glucose schneller vergärt, ändert sich das Verhältnis 1 : 1 zugunsten der Lävulose; infolge davon ändert sich auch das Gärungsverhältnis 1 : 1,78 zugunsten der Lävulose, was zur Folge hat, daß letztere schneller vergärt als es diesem Vergärungsverhältnis entsprechen sollte. Daher auch die rasche Abnahme der Drehung der Polarisationsebene. Selbstverständlich haben diese Werte insofern einen relativen Wert, da sie vermutlich mit Änderung der Versuchsbedingungen zeitlich Verschiedenheiten aufweisen werden. Bei einigen Kreuzversuchen mit Konzentration der Lävulose-Glucosemischung 1 : 1,78 zeigte sich, daß die Vergärung noch mehr zugunsten der Glucose ausfällt, wie es von der Kurve *C* der Abb. 5 illustriert wird. In diesem Falle bewegt sich die Drehung nach links infolge bedeutend schnellerer Vergärungsgeschwindigkeit der Glucose. Das Gärungsverhältnis der Glucose zur Lävulose hängt bekanntlich in bedeutendem Maße von der Art der Hefe ab.

Die Bestimmung der bei der Gärung obiger Mischungen angeführten polarimetrisch bestimmten Verhältnisse muß an der Hand quantitativer Analyse der verwendeten Zuckersorten in den Gärungsflüssigkeiten ergänzt werden, wofür besondere Untersuchungen im Gange sind.

Über die Ursachen der Gärungsbeschleunigung durch Kohle.

Wie bereits zu Beginn erwähnt wurde, hält *Abderhalden* die Entstehung des Acetaldehyds als annehmbarsten Grund der Beschleunigung. Die oben erwähnten Versuche hatten jedoch ergeben, daß die Verdrängung der Kohlensäure durch die Kohle zur Geltung kommt und nachdem andererseits CO_2 als Hemmungsstoff die Lebenstätigkeit der Hefe beeinflußt, muß die Frage der Gärungsbeschleunigung mit dieser von *Söhngen*[1]) ausgedrückten Auffassung in Einklang gebracht werden. Nach *Boussingault*[2]) hat die Verdrängung von CO_2 unter dem verminderten Druck eine bedeutende Beschleunigung der Gärung zur Folge. Da *Söhngen* annimmt, daß eben diese CO_2-Verdrängung durch Kohle eine Hauptursache der Beschleunigung ist, so war es notwendig, einen Versuch unter vermindertem Druck *mit Kohle* anzustellen. Wenn dieser Versuch dieselben Resultate zeigt, wie jener unter vermindertem Druck ohne Kohle, so wäre dies ein Beweis dafür, daß die Gärungsbeschleunigung bloß durch Verdrängung von CO_2 verursacht wäre.

Dieser Versuch wurde in folgender Weise unternommen: In vier Erlenmeyerkolben von je 150 ccm Inhalt kamen 100 ccm 7proz. Glucose

[1]) *Söhngen*, Centralbl. f. Bact. 38, II, 621, 1913.
[2]) *Boussingault*, C. r. 91, 373, 1900.



(gekocht) bzw. Lävuloselösung. Die Gärung in *A* und *B* findet unter normalen, während die in *C* und *D* unter vermindertem Druck von etwa 100 mm Hg statt. Außerdem erhalten *B* und *D* je 5 g Kohle. In allen Proben 5 g Hefe. Temperatur im Thermostaten 22° C. Um einen Vergleich zwischen den Proben ziehen zu können, setzt man *A* und *C* nach bestimmter Zeit der Gärung je 5 g Kohle bei, um damit beiläufig dieselbe Menge an Zucker aus dem Medium durch Adsorption zu entziehen. Diesen Versuch zeigt das beigefügte Protokoll an.

Temperatur = 22° C.

Zuckerart	*A* = 100 ccm 7 proz. Zuckerlösung + 5 g Hefe Proz.	*B* wie *A* + 5 g Kohle Proz.	*C* wie *A* mit vermindertem Druck Proz.	*D* wie *C* + 5 g Kohle Proz.
Glucose nach 6 Stdn.	4,36	3,43	3,70	2,82
Lävulose „ 8 „	3,99	3,08	3,48	2,50

Man sieht deutlich, daß die Zuckerkonzentration in *C* immer geringer ist als in *A*, d. h. die unter vermindertem Druck stehende Flüssigkeit vergärt schneller als die unter normalen Bedingungen stehende. Die Ursache dieser Erscheinung liegt an der Kohlensäureverdrängung aus der gärenden Flüssigkeit und gleichzeitig auf etwas verminderter Konzentration des Alkohols durch Verdunstung. Vergleichen wir aber die Gärungen in *C* und *D*, so sehen wir, daß die Gärung in der Probe, welche unter vermindertem Druck steht und mit Kohle versetzt wurde, eine weit größere Gärungsgeschwindigkeit aufweist als die Probe, welche ohne Kohle unter demselbem Druck stand, obwohl im letzten Falle die CO_2-Verdrängung durch Kohle nicht in Frage kommt. Wir sehen also, daß die Kohlensäureverdrängung durch Kohle keinesfalls der einzige Faktor ist, welcher die Gärungsbeschleunigung durch Kohle hervorruft. Diese Tatsache könnte vielleicht im Sinne der *Abderhalden*schen Annahme gedeutet werden. Wie sich die einzelnen Komponenten der Gärungsbeschleunigung zueinander verhalten, muß weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben.

Auf Grund der obenerwähnten Versuche kann geschlossen werden, daß die Gärungsbeschleunigung, d. h. die schnellere Zuckerzersetzung durch Hefe in Gegenwart von Kohle nicht durch eine einzige Ursache bedingt ist, sondern eine Resultante mehrerer Komponenten darstellt, von denen uns folgende bekannt sind: a) der durch *Neuberg* und *Abderhalden* als gärungsfördernd erwiesene Acetaldehyd; b) die durch Kohle verursachte Kohlensäureverdrängung und daher verminderte CO_2-Konzentration in der Gärungsflüssigkeit und c) die Adsorption des entstehenden Alkohols durch Kohle, wodurch gleichfalls ein stark hemmender Faktor der Flüssigkeit entzogen wird. (Um die Rolle des letztgenannten Faktors festzustellen, wurden besondere Versuche unter-

nommen, welche ergaben, daß unter den zuvor erwähnten Versuchsbedingungen etwa 16 bis 18 Proz. des gesamt entstehenden Alkohols adsorbiert werden.

Es ist wohl wahrscheinlich, daß die Gärungsbeschleunigung durch Kohle auch durch andere Komponenten verursacht wird. Es ist denkbar, daß auch die Adsorption der Hefezellen an Kohle im Sinne eines mechanischen Reizes wirkt.

Zum Schluß sei hervorgehoben, daß die erwähnten Tatsachen sowohl für verschiedene Zuckerkonzentrationen als auch verschiedene Hefepräparate, sowie verschiedene Arten von Kohle ihre volle Geltung behalten.

Es obliegt mir nun noch die angenehme Pflicht, meinem ehemaligen hochverehrten Lehrer und Chef und Institutsvorstande, Herrn Prof. Dr. *M. Miculicich*, für die mir in jeder Hinsicht erwiesene *breitzügige* Unterstützung bei der Arbeit meinen besonderen und innigsten Dank auszusprechen; Dank schulde ich auch Herrn Prof. für technische Mycologie Dr. *L. Gutschy*, dem ich manche Anregung und Beratung zu verdanken habe.

Die Milchsäure als intermediäres Produkt des anoxybiotischen Kohlehydratumsatzes in der Tierzelle.

Von

Julius Stoklasa.

(Aus dem staatlichen radiologischen Institut in Prag.)

(Eingegangen am 8. Februar 1927.)

Mit 1 Abbildung im Text.

Schon *Pasteur* hat gezeigt, daß die Gärung, und zwar sowohl die Alkoholbildung, wie die Milchsäurebildung, als eine Form der Energiegewinnung, die des freien Sauerstoffs nicht bedarf, zu deuten ist. *Dubois-Reymond*[1]) hat diesen Vorgang der Milchsäurebildung im Muskel als einen Fermentationsprozeß aufgefaßt.

Erst in den 80er Jahren gelang es *Claude Bernard*[2]), ein glykolytisches Ferment aus dem Muskel zu *isolieren*, welches seiner Meinung nach die Milchsäurebildung bewirkt. Alle diese Forschungen erbrachten nicht den positiven Nachweis, daß die Milchsäure durch einen rein enzymatischen Prozeß entsteht. *Ich war mit meinen Untersuchungen der erste, dem es gelang, aus dem Tierorganismus Enzyme zu isolieren, die eine Milchsäurebildung hervorrufen. Ich publizierte diese Entdeckung im März 1903 im Zentralblatt für Physiologie*[3]).

Carl Oppenheimer hat schon in seinem bekannten Buche „Die Fermente und ihre Wirkungen" (Verlag von F. C. W. Vogel, Leipzig 1903), meine Befunde zitiert. Er sagt wörtlich: „Soeben veröffentlichte Resultate von *Stoklasa, Jelinek* und *Černý* scheinen nun tatsächlich meine vorläufigen Resultate zu bekräftigen, da ihnen der Nachweis eines echten, milchsäurebildenden Enzyms in den tierischen Organen und im Blute gelungen ist. Sie konnten es aus den Organen nach der *Buchner*schen Methode isolieren und erhielten ziemlich beträchtliche Mengen Milchsäure."

In der Auflage aus dem Jahre 1913 äußerte sich *Oppenheimer* wie folgt: „Der einzige gelungene Versuch, das Alkohol und Milchsäure bildende Ferment aus den Tiergeweben herauszubekommen und seine Wirkungen

---

[1]) *Dubois-Reymond*, Sitz.-Ber. d. Berl. Akad. 1859, S. 288.

[2]) *Claude Bernard*, Leçons sur le diabète, S. 328, Paris 1877; Cours de physiologie au Collège de France **1**, 379, 1886.

[3]) *J. Stoklasa, J. Jelinek, T. Černý*, Zentralbl. f. Physiol. **14**, H. 25, März 1903.



frei von Zellen zu demonstrieren (*Stoklasa*) wird in der heftigsten Weise bestritten; die Bedingungen, unter denen neben der Milchsäure auch Alkohol entsteht, sind völlig undurchsichtig."

Oppenheimer hat damals in seinen Publikationen darauf hingewiesen, daß es niemand gelungen ist, meine Befunde bezüglich der aus dem Tierkörper isolierten glucolytischen Enzyme, welche die Milchsäure- und Alkoholbildung bewirken, zu widerlegen. Er hat damals bereits konstatiert, daß die von *Stoklasa* aus der tierischen Zelle isolierte Zymase Alkohol und Kohlendioxyd und daneben in reichlicher Menge Milchsäure bildet.

Ich war nicht nur der erste, welcher aus dem Pflanzenorganismus die Enzyme isolierte, die die Milchsäurebildung hervorrufen, und konstatierte, daß sich beim anoxybiotischen Prozeß im pflanzlichen Organismus stets Milchsäure bildet, sondern es ist mir auch gelungen, aus dem tierischen Organismus zum ersten Male die glykolytischen Enzyme zu isolieren, die eine Milchsäurebildung aus den Hexosen verursachen.

Schon damals, vor 24 Jahren, stellten wir fest, daß in den Tierorganen, und zwar in der Lunge, im Muskel und im Blute, sich Enzyme vorfinden, welche die Milchsäurebildung und alkoholische Gärung aus der Glucose bewirken. Bei allen unseren Versuchen sind bloß diejenigen Resultate berücksichtigt worden, bei denen ein vollständiger Ausschluß von gärungserregenden Mikroben stattgefunden hatte. Ich konnte auf Grund der damaligen Versuche konstatieren, daß in den alkoholisch-ätherischen Niederschlägen im reinen Preßsaft der Tierorgane Enzyme vorhanden sind, welche sofort eine Milchsäuregärung und alkoholische Gärung hervorrufen. Ich machte bereits damals darauf aufmerksam, daß durch die Bildung der Milchsäure aus der Glucose nicht nur die Tätigkeit des die alkoholische Gärung bewirkenden Enzyms gestört wird, sondern daß auch durch das Vorhandensein der freien Milchsäure die Milchsäuregärung selbst behindert ist. Durch Hinzufügen von Tricalcium- oder Trikaliumphosphat wird allerdings die schädliche Wirkung der Milchsäure paralysiert und der weitere Fortgang der Milchsäuregärung unterstützt. Lassen wir den Alkohol oder Äther bei der Isolierung des Enzyms länger wirken, so bemerken wir, daß das die alkoholische Gärung bewirkende Enzym geschwächt wird und die Gärung erst nach 12 bis 24 Stunden eintritt, und zwar eine vorwiegende Milchsäuregärung.

In meiner Publikation „Sind glykolytische Enzyme im Tierkörper vorhanden?"[1]) habe ich im Jahre 1905 über meine mit aus frischen Muskeln dargestellten Enzymen ausgeführten Versuche berichtet. Ich konstatierte, daß bei sofortiger Gärung stets Milchsäure in verhältnismäßig größeren Quanten auftritt. Auch in meiner Arbeit „Über die glucolytischen Enzyme im Pankreas"[2]) konnte ich die Milchsäure als erstes Produkt der glucolytischen Prozesse feststellen.

Dann erst trat *Embden*[3]) im Jahre 1912 und 1914 mit seiner Arbeit über die Bildung der Milchsäure im Preßsaft des Säugetiermuskels bei

---

[1]) *Julius Stoklasa*, Zentralbl. f. Physiol **18**, Nr. 25, 11. März 1905.

[2]) *Derselbe*, Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. **26**, H. **1**, 1909.

[3]) *Embden*, *Kalberlah* und *Engel*, diese Zeitschr. **45**, 45, 1912; *Embden*, *Griesbach* und *Schmitz*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **93**, **1**, 1914/15.

Zugabe von Hexodiphosphorsäure hervor. Dieselbe Erscheinung konstatierte auch *Bierry* und *Moquet*[1]).

Im vergangenen Jahre publizierte dann *O. Meyerhof*[2]) in dieser Zeitschrift eine Arbeit „Über die enzymatische Milchsäurebildung im Muskelextrakt", in der er meine früheren Forschungen vollkommen bestätigt. Es ist ihm ebenfalls gelungen, die Abtrennung des Milchsäure bildenden Ferments aus dem Muskel zu vollziehen, und er kam zu einem ähnlichen Resultat daß nämlich die Haltbarkeit des Ferments sehr gering ist, und daß jedenfalls die Energie des Enzyms durch Phosphatzusatz erhöht wird, was ich ebenfalls vor 25 Jahren beschrieben hatte.

Wir haben auch weiterhin mit unseren Mitarbeitern auf Grund moderner Apparatur und Versuchsmethodik den Kohlehydratumsatz in der tierischen Zelle sehr intensiv weiter verfolgt und gelangten zu dem Ergebnis, daß die mit meinen Mitarbeitern vor 25 Jahren erzielten Befunde vollkommen richtig sind.

Im Jahre 1916 stellten *Neuberg* und *Färber* das Auftreten von Acetaldehyd als Durchgangsprodukt im intermediären Kohlenhydratstoffwechsel fest. Mit Hilfe des zweiten von *Neuberg* und *Reinfurth* inaugurierten biochemischen Abfangverfahrens ist es gelungen, den Acetaldehyd bei Atmung der Froschmuskulatur der weiteren Verbrennung zu entziehen und in Form des Anhydro-Acetaldehyd-bis-dimethylcyklohexandions (Acetaldomedon) substantiell zu fassen. Der Fixation des als Zwischenglied auftretenden Acetaldehyds stehen mehrere Verfahren zur Verfügung, die *Neuberg* mit *Färber*, *Reinfurth*, *Hirsch* u. a. angegeben hat[3]).

Nach dem Erscheinen dieser Arbeiten ging ich sofort daran, mich zu überzeugen, ob sich bei der durch die Enzyme hervorgerufenen Milchsäure- und alkoholischen Gärung auch stets Acetaldehyd bildet.

Wir haben zu diesem Zwecke weitere neue Versuche mit nach unserer Methode isolierten Rohenzymen vorgenommen, und zwar in derselben Weise, wie wir dies in zahlreichen unserer früheren Arbeiten[4]) bereits beschrieben haben, nur daß wir neben Kohlendioxyd, Milchsäure, Alkohol und Essigsäure auch stets den Acetaldehyd bestimmten. Als Antiseptikum wurde 2proz. Salicylsäure und 2proz. Toluol angewendet. Die Resultate sind in Tabelle I angeführt.

---

[1]) *H. Bierry* und *L. Moquet*, C. r. de la Soc. de biol. **91**, 250, 28. Juni 1924; **93**, 322, 4. Juli 1925.

[2]) *O. Meyerhof*, diese Zeitschr. **178**, H. 4/6, 395, 1926.

[3]) *Carl Neuberg* und *E. Färber*, diese Zeitschr. **78**, 238, 1916; *Carl Neuberg* und *E. Reinfurth*, ebendaselbst **89**, 365, 1918; **92**, 234, 1918; *C. Neuberg* und *J. Hirsch*, ebendaselbst **100**, 304, 1919; **106**, 281, 1920; *C. Neuberg*, *J. Hirsch* und *E. Reinfurth*, ebendaselbst **105**, 307, 1920; *J. Hirsch*, ebendaselbst **134**, 415, 1922; **117**, 113, 1921; *C. Neuberg* und *A. Gottschalk*, ebendaselbst **146**, 164, 1924; **158**, 253, 1925.

[4]) *J. Stoklasa*, V. Int. Kongr. f. angew. Chem, Berlin, 3. Juni 1903; *Stoklasa* und *Černý*, Chem. Ber. **36**, 662, 1903; *J. Stoklasa*, Arch. f. d. ges. Phys. **101**, 1904.



Tabelle I.

Rohenzym aus frischen Muskeln. Die Zahlen sind auf 10 g Rohenzym umgerechnet.

Art der Lösung, in der die Gärung erfolgte	Menge des bei der Gärung entstandenen CO_2 in g					Gesamtmenge				
	Zahl der Stunden					des CO_2	der Milchsäure	des Alkohols	des Acetaldehyds	der Essigsäure
	12	24	48	72	96	g	g	g	g	g
1. 50 ccm 15 proz. Glucose	0,263	0,513	0,052	0,048	0,029	0,905	0,316	0,854	0,183	0,284
2.	0,346	0,417	0,077	0,053	0,012	0,905	0,406	0,776	0,152	0,324
3.	0,282	0,596	0,096	0,014	0,031	1,019	0,377	0,916	0,208	0,372
4.	0,199	0,694	0,061	0,032	0,018	1,004	0,511	0,683	0,174	0,369

Durch diese Resultate wurde bestätigt, daß sich neben Kohlendioxyd, Milchsäure, Alkohol und Essigsäure stets Acetaldehyd als intermediäres Produkt bildet, wie es *Neuberg* und seine Schüler bewiesen hatten.

Um den Nachweis zu erbringen, daß die Milchsäure- und alkoholische Gärung nur durch die Enzyme und nicht durch die Bakterien hervorgerufen wird, haben wir nachfolgende Experimente vorgenommen:

In mehrere Kolben wurden je 50 ccm einer 15proz. Glucoselösung, der 5 g des betreffenden Rohenzyms zugeführt wurden, gebracht und hierauf der gesamte Inhalt des Kolbens gut sterilisiert. In diese sterilisierten Kolben wurde unter Beobachtung aller Kautelen je 10 ccm des Inhalts jener Kolben überimpft, welche nach Beendigung des in der Tabelle angeführten Versuchs resultierten.

Die Ergebnisse dieser Experimente zeigten, daß, trotzdem wir 10 ccm der Lösung benutzt haben, nach einer Wirkungsdauer derselben von 72 Stunden nur 5 bis 16 mg gasförmiges Kohlendioxyd ausgeschieden worden ist. Es ist klar, daß, wenn Bakterien vorhanden gewesen oder noch vorhanden wären, sich mindestens eine zehnfache Kohlendioxydmenge hätte bilden müssen.

Daß Acetaldehyd im intermediären Stoffwechsel der Muskulatur entsteht, hat bereits *Hirsch*[1]) vermutet und tatsächlich nachgewiesen. Es liegt demnach auf der Hand, daß sich bei der Milchsäure- und Alkoholgärung der aus der Muskulatur isolierten Enzyme Acetaldehyd bilden muß.

Heute ist uns der Chemismus des Kohlehydratumsatzes in der pflanzlichen Zelle schon ziemlich klar. Was den tierischen Organismus anbelangt, so hat *Hirsch* angedeutet, daß bei der Glykolyse die Alkoholproduktion, die ich stets verteidigt habe, durch die Feststellung des Acetaldehyds im Bereich der Möglichkeit liegt. Der enzymatische Abbau des Hexosemoleküls und die anoxybiotische Milchsäurebildung in der tierischen Zelle ist noch immer ein offenes Problem, das noch nicht genau durchforscht worden ist. Es liegen zwar die Arbeiten von *Embden, Fletcher, Hill, Hirsch, Hopkins, Meyerhof, Neuberg, Parnas, Ransom, Thunberg* vor,

[1]) *Hirsch*, diese Zeitschr. **134**, 1 bis 4, 1922.

aber der ganze Vorgang ist noch nicht restlos geklärt; *Meyerhof* ist sogar der Ansicht, daß im Anschluß an die anaerobe Milchsäurebildung des tätigen, sowie des ruhenden Froschmuskels ein oxydativer Prozeß mit dem respiratorischen Quotienten = 1 einsetzt, durch den die Hauptmenge bzw. ein Teil der vorhandenen Milchsäure wieder zu Glykogen resynthesiert wird.

Nun treten wir zur Besprechung der Experimente bezüglich der Bildung der Milchsäure bei der anoxybiotischen Atmung der Tierorgane.

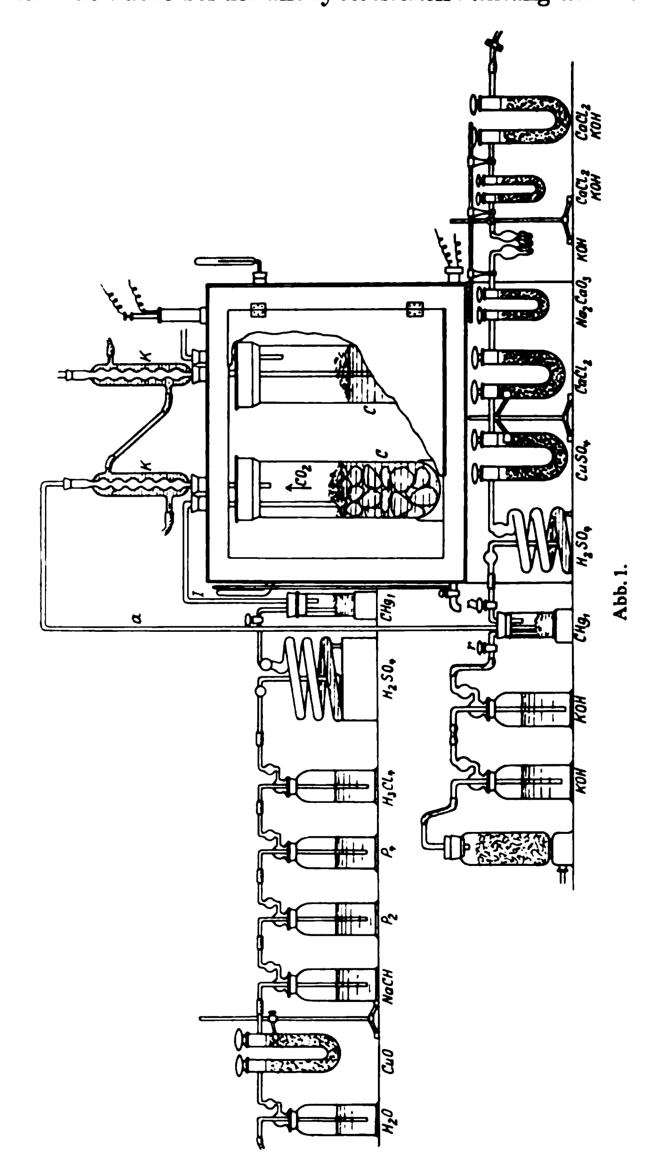


Abb. 1.

Methodik.

Anordnung der Apparate.

Die Anordnung der Apparate war, abgesehen von einzelnen nötigen Modifikationen, dieselbe, wie bei unseren früheren bereits zitierten Arbeiten.

In den Zylindern *CC* befindet sich entweder destilliertes Wasser oder 2,5- bis 3proz. sterilisierte Glucoselösung. Die Zylinder mit der Lösung wurden sterilisiert und im Inkubationsstadium belassen. Die einzelnen Tierorgane wurden in einer 0,5proz. Sublimatlösung erst 30, dann 10 und 5 Minuten bzw. 50, 20 und 10 Minuten sterilisiert, hierauf mit sterilisiertem Wasser abgespült und sofort unter Verwendung einer Flamme bei ihrer Eintragung in die Zylinder, in das destillierte Wasser oder in die Glucoselösung getaucht. Durch diese Flüssigkeit wurde jeden Tag 10 Stunden lang ein Strom von reinem Wasserstoffgas hindurchgetrieben. Der der Gasbombe entströmende Wasserstoff passierte zunächst die mit destilliertem Wasser beschickte Waschflasche H_2O, dann die U-Röhre *CUO*, welche Kupferoxyd enthielt, sodann eine mit konzentrierter Natriumhydroxydlösung gefüllte *Drechsel*sche Waschflasche NaOH und weiter eine ebensolche dritte und vierte PsPs, welche eine alkalische Lösung von Pyrogallussäure (5 g Pyrogallussäure in 15 ccm Wasser und 120 g KOH in 80 ccm Wasser) enthielten, und schließlich eine fünfte Flasche, welche mit 0,5proz. Sublimatlösung $HgCl_2$ beschickt war.

Wenn wir die Einwirkung der Radiumemanation auf die anaerobe Atmung studierten, so wurde das Emanatorium hinter der fünften Flasche angebracht. Das Emanatorium enthielt das Joachimsthaler Material für die Darstellung des Radiums (Erzlaugrückstände), welches vollständig von Uran befreit war und nur Radiumsalze aufwies. Die entstandene Emanation wurde durch den kleineren Zylinder in den größeren Zylinder geführt.

Den 40 bis 60 cm hohen Zylinder *C* von 10 bis 12 cm Durchmesser schließt ein gut sitzender Kautschukpfropfen, der 4 cm tief in den Zylinder hineinragt. Auf den Zylinder ist ein mit Quecksilber gefüllter Glasbehälter so aufgesetzt, daß der obere Teil des Zylinders und der Kautschukpfropfen vollständig in Quecksilber getaucht sind und die Quecksilbersäule um 1 bis 2 cm höher ist, als der Kautschukpfropfen, so daß keine Luft eindringen kann. Durch den zweimal gebohrten Pfropfen führen zwei Glasröhren, von denen die zuleitende (*z*) fast bis zum Boden des Zylinders reicht, um in den Apparaten, in welchen wir frisch zubereitetes Calciumsulfit in Anwendung gebracht haben, das Calciumsulfit, welches sich am Boden sammelt, fortwährend in Bewegung zu halten. Die ableitende Röhre (*a*) des *Liebig*schen Kühlers (*K*) überragt den unteren Rand des Pfropfens um 5 cm. Sie stellen (wie aus Abb. 1 ersichtlich), die Verbindung mit zwei kleineren, 11 cm hohen Zylindern CHg_1, CHg_2, von 5 cm Durchmesser her, die eine 4 cm hohe Quecksilberschicht enthalten. In den kleinen Zylinder, in den die Ableitungsröhre *a* führt, mündet eine knieartig gebogene, mit einem Ablaßhahn versehene Röhre *r*, die in das Quecksilber eintaucht. Die in Quecksilber tauchenden Röhrenteile sind mit sterilisierter Baumwolle gefüllt. Dasselbe gilt von der in die kleinen Zylinder hineinragenden Mündung des Zuleitungs- und Ableitungsrohres *z* und *a*. Das Ableitungsrohr reicht bis in das Quecksilber des zweiten kleineren Zylinders und ist ebenfalls mit sterilisierter Baumwolle gefüllt.

Außer dem Rohre *a* münden, wie schon erwähnt, noch zwei andere, knieartig gebogene, mit Hähnen versehene Röhren *r* und r_1 in diesen

Zylinder CHg_2. Die eine (r) verbindet ihn mit den Absorptionsapparaten für Luftreinigung, während die andere (r_1) zum Heraustreiben des eventuell noch zurückgebliebenen Kohlendioxyds dient.

Die Gase passieren nach ihrem Austritt aus dem Zylinder CHg_2 zuerst einen *Winkler*schen Absorptionsapparat (H_2SO_4), der mit konzentrierter Schwefelsäure gefüllt ist, dann ein 25 cm hohes, 2,5 cm weites U-Rohr ($CuSO_4$) mit Kupfervitriolbimsstein, ferner ein zweites U-förmiges Rohr ($CaCl_2$), welches Chlorcalcium enthält, das häufig erneuert wird. Das völlig getrocknete Kohlendioxyd passiert zuerst eine U-Röhre (Na_2CaO_2), welche mit ausgeglühtem Natronkalk gefüllt ist, sodann den mit Kaliumhydroxyd (Lösung 2 : 3) gefüllten *Geissler*schen Apparat. Um die aus diesem entweichende ganz unbedeutende Menge Wasser und Kohlendioxyd aufzufangen, sind weiter mit festem Kaliumhydroxyd und Calciumchlorid gefüllte U-Röhren ($CaCl_2 + KOH$) vorgelegt. Weiter rückwärts befindet sich noch ein U-förmiges Schutzrohr, dazu bestimmt, das in der Luft enthaltene Kohlendioxyd und die Feuchtigkeit abzuhalten. Es ist mit Calciumchlorid und Kaliumhydroxyd gefüllt und mit dem Aspirator verbunden. Die beiden Apparate Na_2CaO_2 sowie der *Geissler*sche Apparat KOH und die Röhre ($CaCl_2 + KOH$) wurden vor und nach dem Durchleiten der Gase gewogen. Natürlich wurde der Wasserstoff aus dem Absorptionsapparat mit kohlendioxyd- und wasserfreier Luft herausgetrieben. Die Zylinder (C und C) samt den Pfropfen, sowie auch ein Teil der Röhren tauchten in einen kupfernen Thermostaten, der (wie aus Abb. 1 ersichtlich) mit zwei Thermometern und einem genauen Ätherthermoregulator, sowie auf beiden Seiten mit Glasscheiben versehen ist, damit die Vorgänge in den Zylindern verfolgt werden können. Die Zylinder samt Stopfen und zugehörigen Röhren, sowie der Kühler wurden sterilisiert.

Die Pfropfen der Zylinder wurden durch Übergießen mit geschmolzenem Paraffin völlig undurchlässig gemacht. Die oberen Öffnungen des kupfernen Thermostaten wurden vollständig mit Watte verstopft, die mit Carbolsäure imprägniert war.

Wir arrangierten die Experimente so, daß in jedem Thermostaten zwei Parallelversuche ausgeführt wurden. Die erste Gruppe der Experimente umfaßte die Kontrollversuche, welche ohne Einwirkung der Radioaktivität vor sich gingen. Die zweite Gruppe bezweckte die Feststellung des Einflusses der Radiumemanation bzw. der Beta- und Gammastrahlen, sowie der reinen Gammastrahlen auf den anaeroben Stoffwechsel der Tierorgane, sowie seiner Beziehungen zur Milchsäure-und alkoholischen Gärung. Bei den Versuchen bezüglich des Einflusses der Beta- und Gammastrahlen wurden Glasröhren oder Glaslinsen in den Zylinder gebracht, welche entweder radioaktives Material, und zwar Erzlaugrückstände, oder komprimierte Radiumemanation enthielten. Bei den Versuchen zur Bestimmung des Einflusses der Gammastrahlen wurden die mit radioaktivem Material oder mit komprimierter Radiumemanation gefüllten Glasröhren in Bleiröhren von 2 mm Stärke eingeschmolzen, und mit einer schwachen Paraffinschicht überzogen.

Bei den Versuchen mit Alphastrahlen wurden pro 100 g Trockensubstanz 20 Liter Wasserstoff mit Radiumemanation verwendet. Die Stärke der Radiumemanation betrug pro 1 Liter 60 ME, entsprechend $8184 \,.\, 10^{-8}$ mcu $= 21840 \,.\, 10^{-12}$ g Ra = 0,00002184 mg Ra.

Bei den Versuchen mit Beta- und Gammastrahlen wurden für 100 g Trockensubstanz 100 g des Joachimsthaler Materials zur Gewinnung von

Radium, der sogenannten Erzlaugrückstände, angewendet. Diese 100 g wurden in Glasröhren (Beta- und Gammastrahlen) bzw. in Bleiröhren (Gammastrahlen allein) eingeschmolzen; es wurden fünf bis sechs Stück dieser Röhren verwendet. Die Anordnung des Versuchs war folgende: Es wurden größere Zylinder verwendet, damit mehr Material zur Anwendung kommen kann, und das abgeleitete Kohlendioxyd wurde in Erlenmeyerkolben, die mit konzentriertem Natriumhydroxyd gefüllt waren, absorbiert. Die Apparatur war in einem großen Thermostat aufgestellt, wo ihr reiner Wasserstoff zugeführt wurde. Die Temperatur im Thermostat betrug 37 bis 38° C. Die Versuche dauerten 3 bis 6 Tage. Es ist hierbei folgendes in Erwägung zu ziehen:

In der Ionisationskammer des *Schmidt*schen Elektrometers hält 1 g Nasturan unter verschiedenen Bedingungen bei der Spannung des Sättigungsstromes einen elektrischen Strom aufrecht, welcher dem Ionisationseffekt folgender Mengen radioaktiver Stoffe entspricht:

1. Falls 1 g Nasturan
   a) in einer kleinen Glasröhre eingeschmolzen ist (Beta- und Gammastrahlen):
   $0{,}08\ \mathrm{ME} = 2{,}91 \cdot 10^{-8}\ \mathrm{mcu} = 29{,}1 \cdot 10^{-12}\ \mathrm{g\ Ra}$;
   b) in einer Bleiröhre von der Wandstärke 2 mm eingeschmolzen ist (Gammastrahlen allein):
   $0{,}017\ \mathrm{ME} = 6{,}2 \cdot 10^{-9}\ \mathrm{mcu} = 6{,}2 \cdot 10^{-12}\ \mathrm{g\ Ra}$;
   c) lose aufgeschüttet ist:
   $78\ \mathrm{ME} = 2{,}84 \cdot 10^{-5}\ \mathrm{mcu} = 28400 \cdot 10^{-12}\ \mathrm{g\ Ra}$,
2. Falls 1 g Erzlaugrückstände
   a) in einer Glasröhre eingeschmolzen ist (Beta- und Gammastrahlen):
   $0{,}15\ \mathrm{ME} = 5{,}46 \cdot 10^{-8}\ \mathrm{mcu} = 54{,}6 \cdot 10^{-12}\ \mathrm{g\ Ra}$,
   b) in einer Bleiröhre von der Wandstärke 2 mm eingeschmolzen ist (Gammastrahlen allein):
   $0{,}02\ \mathrm{ME} = 7{,}28 \cdot 10^{-9}\ \mathrm{mcu} = 7{,}28 \cdot 10^{-12}\ \mathrm{g\ Ra}$,
   c) lose aufgeschüttet ist:
   $90\ \mathrm{ME} = 3{,}27 \cdot 10^{-5}\ \mathrm{mcu} = 32760 \cdot 10^{-12}\ \mathrm{g\ Ra}$.

Die Bleiröhren waren in sehr feine Gummi gehüllt.

Durchführung der neuen Atmungsversuche.

Wir bedienten uns wieder der beschriebenen Apparatur, und die ganze Manipulation ging unter strenger Wahrung aller Kautelen der Asepsis vor sich. Wir berücksichtigten nur diejenigen Resultate, bei welchen wir uns durch Gelatineplattenguß, sowie durch Impfung mit der Platinöse in Zuckerbouillon mit untrüglicher Sicherheit überzeugt haben, daß wir unter völligem Ausschluß von Mikroben arbeiten, und daß sich alle Tierorgane in einem vollständig bakterien- und hyphomycetenfreien Medium befinden. Auch von der völligen Abwesenheit der anaeroben Bakterien haben wir uns nach der Methode *Fränkl-Hueppe* überzeugt. Daher können wir mit absoluter Bestimmtheit

erklären, daß die Phasen der anaeroben Atmung der Tierzelle, und zwar die Bildung von Milchsäure bei völliger Abwesenheit von Bakterien stattgefunden hat. Die Zylinder wurden mit sterilisierten, gut anliegenden Pfropfen, die mit den in meinen zitierten Arbeiten beschriebenen Apparaten verbunden waren, verschlossen und die Verschlußstelle samt den Pfropfen durch Übergießen mit geschmolzenem Paraffin völlig undurchlässig gemacht. Wie schon erwähnt, befindet sich eine Quecksilberschicht über dem Pfropfen. Durch die Zylinder wurde reines Wasserstoffgas, und zwar zu 18 bis 20 Liter, innerhalb 24 Stunden getrieben.

Während des Atmungsprozesses wurde die Lösung, in welcher sich die Tierorgane befanden, vollständig klar, sie zeigte keinerlei Trübung. Wies die Lösung eine Trübung auf, die durch Bakterien hervorgerufen wurde, so schalteten wir den Versuch aus. Zu den Versuchen bezüglich der anaeroben Atmung wurden die einzelnen Tierorgane entweder in sterilisiertes Wasser oder in 2,5proz. Glucoselösung gebracht. Man verwendete etwa 300 bis 500 ccm der betreffenden Flüssigkeit, so daß sich die Tierorgane 5 bis 10 cm unterhalb der Oberfläche des Wassers bzw. der Glucoselösung befanden.

Nach Beendigung der Versuche zeigten die Tierorgane ein vollkommen frisches Aussehen und man konnte nur einen ganz leichten Alkoholgeruch konstatieren.

Um uns zu überzeugen, daß der ganze Prozeß der anaeroben Atmung ohne jegliche Mitwirkung der Bakterien stattgefunden hat, führten wir nachstehende Experimente aus: 100 bis 200 g sehr sorgfältig sterilisierter Tierorgane, in denen die Enzyme vollständig vernichtet waren, wurden in einem sterilisierten Atmungsapparat in sterilisierte, 2,5proz. Glucoselösung getaucht und dann mittels sterilisierter Pipette mit 5 ccm Gärflüssigkeit aus den einzelnen Atmungszylindern geimpft. Dabei beobachteten wir, ob Milchsäure entsteht. Bei keinem unserer ganz exakt ausgeführten Versuche war eine Gärung zu konstatieren.

Ergebnisse unserer Beobachtungen bezüglich des Einflusses der Radioaktivität auf die anaerobe Atmung der Tierorgane.

Versuche ohne Radioaktivität.

Ich führe im nachstehenden unsere mit Muskeln ausgeführten Versuche an. Die Daten sind auf 1000 g Trockensubstanz umgerechnet.

1. Versuch.

Gewicht der Muskeln	478 g
Trockensubstanz	24,222 Proz.
Temperatur	37 bis 38° C
Versuchsdauer	72 Stunden

In 2,5proz. sterilisierter Glucoselösung.

Kohlendioxyd, ausgeatmet innerhalb 72 Stunden	1,025 g
Kohlendioxyd in der Lösung	0,082 g
Kohlendioxyd im Muskel	0,171 g
Kohlendioxyd, Gesamtmenge	1,278 g
Milchsäure in der Lösung	0,843 g
Milchsäure im Muskel	0,091 g
Milchsäure, Gesamtmenge	0,934 g

2. Versuch.

Gewicht der Muskeln	454 g
Trockensubstanz	23,76 Proz.
Temperatur	37 bis 38° C
Versuchsdauer	90 Stunden

In 2,5proz. sterilisierter Glucoselösung.

Kohlendioxyd, ausgeatmet innerhalb 90 Stunden	1,092 g
Kohlendioxyd in der Lösung	0,091 g
Kohlendioxyd im Muskel	0,117 g
Kohlendioxyd, Gesamtmenge	1,300 g
Milchsäure in der Lösung	0,833 g
Milchsäure im Muskel	0,114 g
Milchsäure, Gesamtmenge	0,947 g

3. Versuch.

Gewicht der Muskeln	525 g
Trockensubstanz	24,59 Proz.
Temperatur	37 bis 38° C
Versuchsdauer	94 Stunden

In 2,5proz. sterilisierter Glucoselösung.

Kohlendioxyd, ausgeatmet innerhalb 94 Stunden	1,126 g
Kohlendioxyd in der Lösung	0,075 g
Kohlendioxyd im Muskel	0,203 g
Kohlendioxyd, Gesamtmenge	1,404 g
Milchsäure in der Lösung	0,952 g
Milchsäure im Muskel	0,119 g
Milchsäure, Gesamtmenge	1,071 g

4. Versuch.

Gewicht der Muskeln	566 g
Trockensubstanz	22,73 Proz.
Temperatur	37 bis 38° C
Versuchsdauer	98 Stunden

In 2,5proz. sterilisierter Glucoselösung.

Kohlendioxyd, ausgeatmet innerhalb 98 Stunden	1,292 g
Kohlendioxyd in der Lösung	0,061 g
Kohlendioxyd im Muskel	0,158 g
Kohlendioxyd, Gesamtmenge	1,511 g
Milchsäure in der Lösung	0,997 g
Milchsäure im Muskel	0,089 g
Milchsäure, Gesamtmenge	1,086 g

Wir sehen aus diesen Zahlen, daß die Milchsäure bei der anoxybiotischen Atmung der Muskelzelle als erstes Produkt des Kohlehydratumsatzes entsteht. Aus der Milchsäure bildet sich Alkohol und Kohlendioxyd und weiter aus dem Alkohol Acetaldehyd und Essigsäure unter Produktion von Kohlendioxyd.

Versuche bezüglich der Einwirkung der Radioaktivität.

Von großem Interesse ist der Einfluß der Radioaktivität auf die Milchsäurebildung in der Muskelzelle. Wir haben Versuche mit Radiumemanation, Beta- und Gammastrahlen und Gammastrahlen allein vorgenommen. Ich führe im nachstehenden unsere Resultate, umgerechnet auf 1000 g Trockensubstanz, an. Die Versuchsdauer betrug 102 Stunden, die Temperatur 37 bis 38⁰ C.

A. Radiumemanation.

Gesamt-Kohlendioxyd	2,086 g
Gesamt-Milchsäure	0,274 g

B. Beta- und Gammastrahlen.

Gesamt-Kohlendioxyd	0,374 g
Gesamt-Milchsäure	2,544 g

C. Gammastrahlen.

Gesamt-Kohlendioxyd	0,537 g
Gesamt-Milchsäure	2,094 g

D. Kontrollversuch ohne Radioaktivität.

Gesamt-Kohlendioxyd	1,161 g
Gesamt-Milchsäure	0,884 g

Wir haben die Versuche bei derselben Temperatur und Versuchsdauer nochmals wiederholt und erhielten nachstehende Resultate. Die Zahlen sind auf 1000 g Trockensubstanz umgerechnet:

A. Radiumemanation.

Gesamt-Kohlendioxyd	2,147 g
Gesamt-Milchsäure	0,316 g

B. Beta- und Gammastrahlen.

Gesamt-Kohlendioxyd	0,289 g
Gesamt-Milchsäure	2,073 g

C. Gammastrahlen.

Gesamt-Kohlendioxyd	0,394 g
Gesamt-Milchsäure	2,004 g

D. Kontrollversuch ohne Radioaktivität.

Gesamt-Kohlendioxyd	1,206 g
Gesamt-Milchsäure	0,914 g

Diese von uns erzielten Resultate sind sehr lehrreich, denn es wird bestätigt, daß bei den anoxybiotischen Prozessen Milchsäure entsteht, was wir bei unseren früheren Versuchen bereits beobachtet haben.

Wir fanden pro 1000 g Trockensubstanz des Muskels beim ersten Versuch 0,934 g, beim zweiten Versuch 0,947 g, beim dritten Versuch 1,071 g und beim vierten Versuch 1,086 g Gesamt-Milchsäure.

Vor dem Versuch wurde in dem zum Experiment verwendeten Muskel stets Milchsäure nachgewiesen, und zwar ungefähr 0,06 bis 0,1 g pro 1000 g Trockensubstanz.

Diese vor dem Versuch in dem Muskel festgestellte Quantität Milchsäure wurde dann von den nach dem Prozeß der anaeroben Atmung konstatierten Mengen Milchsäure abgezogen.

Interessant sind die Versuche, die bei Einwirkung von Radioaktivität ausgeführt wurden. Unter dem Einfluß der Radiumemanation, die vorwiegend Alphastrahlen enthält, wurde, trotzdem sich anaerobe Prozesse abspielten, sehr viel *Kohlendioxyd gebildet.* Das Kohlendioxyd entsteht durch enzymatische Spaltung der Milchsäure in Alkohol und Kohlendioxyd und durch enzymatische Oxydation des Alkohols.

Bei Einwirkung von Beta- und Gammastrahlen wiederum sinkt die Kohlendioxydmenge, aber der Gehalt an Milchsäure tritt energisch in den Vordergrund. Dasselbe konnten wir bei Einwirkung der Gammastrahlen allein beobachten.

Wir finden beim ersten Versuch unter Einwirkung der Radiumemanation eine Kohlendioxydproduktion von 2,086 g, beim zweiten

Versuch eine solche von 2,147 g. Die Milchsäurebildung beträgt unter dem Einfluß der Radiumemanation im ersten Falle 0,274 g, im zweiten Falle 0,316 g.

Bei den Versuchen mit Beta- und Gammastrahlen belief sich die Kohlendioxydbildung im ersten Falle auf 0,374 g, im zweiten Falle auf 0,289 g; die Milchsäuremengen betrugen im ersten Falle 2,544 g, im zweiten Falle 2,073 g.

Die Gammastrahlen bewirkten im ersten Versuch eine Kohlendioxydbildung von 0,537 g, im zweiten Falle von 0,394 g, und eine Milchsäurebildung von 2,094 g im ersten und von 2,004 g im zweiten Falle.

Die Kontrollversuche zeigten folgendes Bild: Kohlendioxydproduktion im ersten Falle 1,161 g, im zweiten Falle 1,206 g, die Milchsäuremengen beliefen sich auf 0,884 g im ersten Falle und 0,914 g im zweiten Falle.

Diese Daten zeigen wieder, daß, wie ich bereits in meiner Arbeit „Über den Chemismus des Zuckerabbaues in der lebenden Pflanzenzelle und den Einfluß der Radioaktivität auf die anaerobe Atmung der Pflanzenorganismen" (Chemie der Zelle und Gewebe *12*, H. 5, 1926) betont habe, durch die Einwirkung der Alphastrahlen bzw. der Radiumemanation die Atmungsintensität der chlorophyllhaltigen und chlorophyllosen Zelle ungemein erhöht wird, namentlich bei Gegenwart von Sauerstoff. Wenn Sauerstoff vorhanden ist, so bewirkt die Radiumemanation eine Erhöhung der Kohlendioxydproduktion von 40 bis 90 Proz. Unsere zahlreichen Versuche, die wir bezüglich des Einflusses der Radiumemanation auf den Atmungsprozeß vorgenommen haben, sprechen ganz deutlich dafür, daß ein bestimmter Zusammenhang zwischen der Wirkung der Radiumemanation und der Sauerstoffkonzentration besteht. Je stärker die Radiumemanation ist, desto mehr Sauerstoff ist nötig, damit der Dissimilationsprozeß normal vor sich geht. Kurz gesagt, die Radiumemanation bzw. die Wirkung der Alphastrahlen unterstützt dann die ganzen enzymatischen Prozesse, wenn Sauerstoff in genügender Menge vorhanden ist.

Die Dissimilationsprozesse gehen sehr energisch vor sich, wenn in der Atmosphäre 26,2 bis 83 ME Ra Em = Ra Em entsprechend $9536 \cdot 10^{-12}$ g Ra = 0,00000954 mg Ra bis $30212 \cdot 10^{-12}$ g Ra = 0,0000302 g Ra vorhanden sind.

Durch die Beta- und Gammastrahlen, welche das Protoplasma der Zelle durchdringen, und durch die Betastrahlen des Kaliums, welches im Tierorganismus vorhanden ist, findet ein Anstoß auf die glucolytischen Enzyme statt. Es geht eine anoxydative Spaltung der Kohlehydrate

vor sich, und zwar entsteht durch Einwirkung der glucolytischen Enzyme zuerst Milchsäure, und aus der Milchsäure bilden sich Alkohol, Acetaldehyd, Essigsäure und Kohlendioxyd.

Bei diesem scheinbar anaeroben Lebensprozeß entreißen die Atmungsenzyme den im Karyoplasma enthaltenen Oxygenasen den angehäuften Sauerstoff, wodurch die aeroben Oxydationsprozesse auch unter diesen scheinbar anoxydativen Bedingungen die Oberhand gewinnen.

Es haben auch schon *Unna*[1]), *Löb*[2]) und *Spitzer*[3]) nachgewiesen, daß im Karyoplasma Sauerstoff angehäuft ist. Unter Mitwirkung von paramagnetischem Eisen gehen langsame oxydative Phasen vor sich, bei welchen der Alkohol nur teilweise in Acetaldehyd, weiter in Essigsäure verwandelt wird. Bei Zutritt von Sauerstoff wird die Intensität dieser Prozesse bedeutend gesteigert.

Ich verweise hier auf die interessanten und lehrreichen Mitteilungen von *Walter Thörner*: „Über den Sauerstoffstrom im tierischen Gewebe, Sauerstofforte und Reduktionsorte nach *P. G. Unna*"[4]), in welchen er die Zellkerne als primäre oder stabile Sauerstofforte bezeichnet. Daß an den Sauerstofforten tatsächlich gespeicherter freier Sauerstoff vorhanden ist, ergibt sich daraus, daß eine mehr oder weniger starke Bläuung dieser Stellen auch dann auftritt, wenn man die Rongalitweißmethode unter Ausschluß des Luftsauerstoffs vornimmt.

Zum Studium der Einwirkung der Alphastrahlen haben wir Radiumemanation verwendet.

Aus der Emanation entsteht das Radium A (Ra A), das weiter mit der Halbwertszeit von 3 Minuten unter Aussendung von Alphastrahlen zerfällt und dabei in das Beta- und Gammastrahlen emittierende Radium B (Ra B) umgewandelt wird. Letzteres hat eine Halbwertszeit von 26,8 Minuten und ergibt bei seiner Umwandlung das Radium C (Ra C), das eine Halbwertszeit von 19,5 Minuten aufweist und Alpha-, Beta- und Gammastrahlen aussendet.

In der Radiumemanation sind, wie erwähnt, hauptsächlich Alphastrahlen, aber auch gewisse Mengen Beta- und Gammastrahlen vertreten. Um nun nachzuweisen, daß die durch die Emanation bewirkten oxydativen Phasen von den Alphastrahlen, welche die Wirkung der Beta- und Gammastrahlen verdrängen, hervorgerufen werden, haben wir Versuche mit Ionium vorgenommen.

---

[1]) *P. G. Unna*, Biochemie der Haut, Hamburg 1913; Arch. f. mikroskop. Anatomie 78, 1911; 87, 1911; Medizin. Klin. 1912, Nr. 23; Berl. klin. Wochenschr. 1913, Nr. 13, S. 17.

[2]) *Löb*, Dynamik des belebten Stoffes, 1910 (russisch).

[3]) *Spitzer*, Pflügers Arch. 1897, S. 67.

[4]) *Walter Thörner*, Die Naturwissenschaften, H. 14, Jahrg. IX, 1921.

Das Ionium emittiert nur Alphastrahlen der charakteristischen Reichweite 3,0 cm, die nur wenig größer ist als die Reichweite der Alphastrahlen des Uraniums selbst. Boltwood fand, daß das Ioniumpräparat anfangs eine ausgeprägte Alphastrahlenaktivität zeigte. Diese fiel jedoch mit der Zeit mit einer Periode von 22 Tagen ab, woraus hervorging, daß sie dem Ur X, das vom Mineral mit dem Ionium abgeschieden wird, zukam.

Wir haben selbst Ioniumpräparate aus den Sodaniederschlägen, welche bei der Erzeugung des Radiums in Joachimsthal als Abfallprodukte aus dem Nasturan gewonnen werden und pro 100 g 7 mg Ionium enthalten, dargestellt und mit diesen sehr ioniumreichen Präparaten Versuche vorgenommen. Die Präparate enthielten, wie wir uns überzeugt haben, bloß sehr geringe Quantitäten Thorium. Weiter erzeugten wir Ioniumtetrachlorid und führten mit demselben Injektionen des Muskels aus. Wir verwendeten etwa 10 bis 60 mg Ionium in Form von Ioniumtetrachlorid pro 420 bis 560 g Muskel.

Diese Versuche, über welche ich nächstens referieren werde, sind sehr interessant und bringen den Nachweis, daß die Alphastrahlen des Ioniums die oxydativen Phasen ungemein unterstützen und die Milchsäure vollständig zum Verschwinden bringen, also dieselbe Erscheinung, die wir bei Einwirkung von Radiumemanation, die hauptsächlich aus α-Strahlen besteht, konstatierten. Auch über die Verwendung der Ioniumpräparate zur Therapie der Carcinom- und Sarkomzellen werde ich in meiner nächsten Publikation ausführlich berichten. Die Carcinom- und Sarkomzellen befinden sich in einem gewissen anoxybiotischen Zustande, und durch Einwirkung der Betastrahlen des im tierischen Organismus vorhandenen Kaliums wird die Milchsäurebildung intensiv unterstützt. Durch Anwendung von Ioniumpräparaten und Sauerstoff ist uns die Möglichkeit geboten, eine normale Atmung der Carcinom- und Sarkomzellen zu erreichen.

Wenn wir die Ätiologie sowie den Stoffwechsel der Carcinomzelle, namentlich die Milchsäurebildung beim Wachstum nach den Forschungen von *Warburg*[1]) und seinen Mitarbeitern näher betrachten, so erkennen wir, daß es nur anoxybiotische Prozesse sind, bei denen unter Mitwirkung der β-Strahlen des Kaliums Milchsäure in reichlichem Maße gebildet wird. Es ist ein noch ungelöstes Problem, ob die Therapie der Carcinome mit β- und γ-Strahlen zu einem tatsächlichen Erfolge führen kann, da dieselben die Milchsäurebildung unterstützen. Sicher ist, daß nicht nur beim menschlichen, sondern auch beim pflanzlichen Organismus eine Anhäufung von Kalium in den

---

[1]) *Otto Warburg*, Über den Stoffwechsel der Tumoren. Berlin 1926.



Tumorzellen stattfindet und zwar ist dies namentlich bei der Zuckerrübe und Kartoffel der Fall, die bekanntlich verhältnismäßig reich an Kalium sind.

Befindet sich der menschliche Organismus in pathologischem Zustande, so enthält der Schweiß stets Milchsäure. Ich habe mich durch zahlreiche Beobachtungen überzeugt, daß bei Kranken, die stark geschwitzt haben, in dem aus der Wäsche ausgepreßten Schweiß stets neben größeren Mengen Milchsäure auch Essigsäure und Ameisensäure nachweisbar waren.

Über den Chemismus der Anoxybiose der tierischen Organe werde ich demnächst eine ausführliche Arbeit veröffentlichen.

Über Adsorption und Osmose von Alkalien in ein Gelatinegel mit und ohne Lecithinzusatz

Von

Ichizo Suganuma (Tokio).

(Aus dem Kolloid-Chemischen Laboratorium von Professor *J. Traube* Technische Hochschule Berlin-Charlottenburg.)

(Eingegangen am 3. Februar 1927.)

Mit 7 Abbildungen im Text.

In dieser Zeitschrift wurden einige Arbeiten veröffentlicht, von *T. Tomita*[1]), *S. Yumikura*[2]) und *J. Traube*[3]) insbesondere über die Adsorption und Osmose oberflächenaktiver Säuren und Alkohole in Gelen mit und ohne Lipoidzusatz, welche zu dem Ergebnis führten, daß die einfachen Beziehungen, welche *Traube* zwischen Oberflächenaktivität und Permeabilität an tierischen und pflanzlichen Zellen festgestellt hatte, auf die Adsorption und Osmose in Gelen nicht ohne weiteres übertragen werden durften. Obwohl *Traube* an den Grundlagen der Oberflächenaktivitätstheorie festhalten konnte, schien der Schluß gerechtfertigt, daß die Lipoide doch vielfach eine größere Rolle spielen, als von *Traube* angenommen war.

Für Alkalien und insbesondere Amine hatte *Harvey*[4]) mit Hilfe eines Indikators Neutralrot früher gezeigt, daß die Amine um so leichter in Pflanzenzellen eindringen, je oberflächenaktiver sie sind, ein Ergebnis, welches mit den übrigen Feststellungen von *Traube*, *Overton* usw. in bestem Einklang steht.

Es mußte nun interessieren, nach den von *Tomita* und *Yumikura* angewandten Methoden auch die Adsorption und Osmose von Alkalien

---

[1]) *Tomita*, diese Zeitschr. **153**, 335, 1924.

[2]) *Yumikura*, ebendaselbst **157**, 371 und 377, 1925.

[3]) *Traube*, ebendaselbst **153**, 358, 1924; **157**, 383, 1925.

[4]) *Harvey*, Journ. Exp. Zool. **10**, 507, 1911 und Carnegie Inst. of Washington Publ. No. 183.

und insbesondere von Aminen in ein Gelatinegel mit und ohne Lipoidzusatz zu untersuchen.

Auf Vorschlag des Herrn Professor *J. Traube* unternahm ich diese Aufgabe. In bezug auf die angewandte Methode kann auf die Arbeiten von *Tomita* und *Yumikura* verwiesen werden. Je 50 ccm eines aus reinster Gelatine hergestellten Sols ließ ich in denselben Schalen gelieren, mit denen *Tomita* und *Yumikura* gearbeitet hatten. Das Lecithin wurde in feinster Verreibung mit dem Gelatinesol vermischt.

Die Entnahme der Lösung nach bestimmten Zeiten, die Titration mit Neutralrot und die Berechnung der Molzahl erfolgte in der gleichen Weise wie bei *Tomita* und *Yumikura*. Die folgenden Tabellen sind daher ohne weiteres verständlich. Zur Titration wurden stets 2,5 ccm der über dem Gel befindlichen Lösungen entnommen.

Adsorption und Osmose der Alkalien in ein 5 proz. Gelatinegel ohne Lipoidzusatz.

Tabelle I. n/5 KOH.

Zeit	Volumen der Lösung ccm	Zur Neutralisation erforderliche Anzahl ccm n/5 HCl	Molzahlen in der Lösung	Molzahlen in dem Gel
0′	30,0	2,50	0,0060	0,0
3′	28,6	1,60	0,0037	0,0023
15′	27,4	1,30	0,0029	0,0031
30′	26,4	1,00	0,0021	0,0039
1h	25,2	0,75	0,0015	0,0045
2h	23,4	0,70	0,0013	0,0047
24h	10,1	0,60	0,0005	0,0055

Tabelle II. n/5 NaOH.

Zeit	Volumen der Lösung ccm	Zur Neutralisation erforderliche Anzahl ccm n/5 HCl	Molzahlen in der Lösung	Molzahlen in dem Gel
0′	30,0	2,50	0,0060	0,0
3′	28,3	1,90	0,0043	0,0017
15′	26,8	1,40	0,0030	0,0030
30′	25,6	1,10	0,0023	0,0037
1h	23,9	0,85	0,0016	0,0044
2h	22,0	0,75	0,0013	0,0047
24h	9,9	0,58	0,0005	0,0055

Tabelle III. n/5 NH_3.

Zeit	Volumen der Lösung ccm	Zur Neutralisation erforderliche Anzahl ccm n/5 HCl	Molzahlen in der Lösung	Molzahlen in dem Gel
0′	30,0	2,50	0,0060	0,0
3′	28,6	1,70	0,0039	0,0021
15′	27,6	1,25	0,0028	0,0032
30′	26,6	1,05	0,0022	0,0038
1h	25,6	0,75	0,0015	0,0045
2h	24,2	0,60	0,0012	0,0048
24h	15,9	0,40	0,0005	0,0055

Tabelle IV. n/5 $(C_2H_5)_2HN$.

Zeit	Volumen der Lösung ccm	Zur Neutralisation erforderliche Anzahl ccm n/5 HCl	Molzahlen in der Lösung	Molzahlen in dem Gel
0′	30,0	2,50	0,0060	0,0
3′	27,5	1,70	0,0037	0,0023
15′	25,5	1,60	0,0033	0,0027
30′	23,9	1,42	0,0027	0,0033
1h	21,5	1,08	0,0019	0,0041
2h	18,9	0,75	0,0011	0,0049
24h	6,5	0,45	0,0002	0,0058

Tabelle V. n/5 $(CH_3)_3N$.

Zeit	Volumen der Lösung ccm	Zur Neutralisation erforderliche Anzahl ccm n/5 HCl	Molzahlen in der Lösung	Molzahlen in dem Gel
0′	30,0	2,50	0,0060	0,0
3′	28,2	1,85	0,0042	0,0018
15′	27,1	1,45	0,0031	0,0029
30′	26,4	1,10	0,0023	0,0037
1h	25,4	0,85	0,0017	0,0043
2h	24,1	0,60	0,0012	0,0048
24h	15,2	0,20	0,0002	0,0058

Die Versuche führten zu dem Ergebnis, *daß die Adsorption der stark oberflächenaktiven Amine, Diäthylamin und Trimethylamin, nicht größer, sondern eher noch etwas geringer ist als diejenige des Ammoniaks.* Siehe die Kurven Abb. 1.

Bemerkenswert ist auch die Langsamkeit, mit welcher die Adsorption fortschreitet.

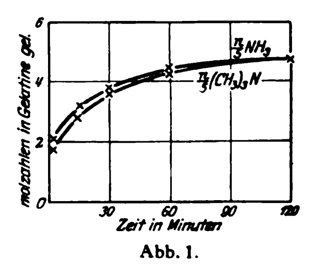


Abb. 1.

Adsorption und Osmose von n/5 Lösungen der Alkalien und Amine in ein 5proz. Gelatinegel mit 2 Proz. Lecithinzusatz.

Tabelle VI.

Zeit	n/5 KOH		n/5 NH_3		n/5 $(C_2H_5)_2HN$	
	Volumen der Lösung ccm	Zur Neutralisation erforderliche Anzahl ccm n/5 HCl	Volumen der Lösung ccm	Zur Neutralisation erforderliche Anzahl ccm n/5 HCl	Volumen der Lösung ccm	Zur Neutralisation erforderliche Anzahl ccm n/5 HCl
0′	30,0	2,50	30,0	2,50	30,0	2,50
3′	28,3	2,01	28,3	2,08	27,4	2,27
15′	26,5	1,50	26,5	1,77	25,4	2,00
30′	25,4	1,12	25,2	1,22	24,1	1,72
1h	23,6	0,96	23,4	0,97	22,6	1,35
2h	21,6	0,80	21,2	0,79	20,6	1,13
24h	10,1	0,51	9,3	0,58	9,5	0,53

Abb. 2. n/5 KOH.

Abb. 3. n/5 $(C_2H_5)_2HN$.

Ein Vergleich der Tabelle VI mit den vorhergehenden Tabellen, sowie die Abb. 2 und 3 zeigen, *daß die Adsorption und Osmose von Kalihydrat, sowie auch Ammoniak und Diäthylamin, also einer Verbindung von hoher Oberflächenaktivität durch den Lecithinzusatz vermindert wird.*

Adsorption und Osmose von n/2 Lösungen von Diäthylamin und Trimethylamin in ein 5proz. Gelatinegel mit und ohne Lecithinzusatz.

Tabelle VII. n/2 $(C_2H_5)_2HN$, n/2 $(C_2H_5)_3N$.

Zeit	Ohne Lecithinzusatz				Mit 5 Proz. Lecithinzusatz			
	n/2 $(C_2H_5)_2HN$		n/2 $(C_2H_5)_3N$		n/2 $(C_2H_5)_2HN$		n/2 $(C_2H_5)_3N$	
	Volumen der Lösung	Anzahl ccm n/2 HCl	Volumen der Lösung	Anzahl ccm n/2 HCl	Volumen der Lösung	Anzahl ccm n/2 HCl	Volumen der Lösung	Anzahl ccm n/2 HCl
0′	30,0	2,50	30,0	2,50	30,0	2,50	30,0	2,50
3′	27,9	2,27	27,8	2,07	28,3	2,04	27,9	2,23
15′	25,9	1,94	25,3	1,85	27,2	1,97	26,4	1,88
30′	24,6	1,63	23,7	1,47	26,2	1,71	25,0	1,46
1h	22,5	1,35	21,8	1,12	25,0	1,40	23,6	1,17
2h	20,0	1,00	19,3	0,85	23,2	1,15	21,9	0,87
24h	7,1	0,58	8,8	0,30	13,1	0,63	10,9	0,32

Tabelle VII und Abb. 4 zeigen, daß für die konzentrierteren n/2 Lösungen der oberflächenaktiven Amine, Diäthylamin und Trimethylamin, die entsprechenden Kurven für die Gele mit und ohne Lecithin nahezu zusammenfallen. Es wurde daher nur die eine Kurve gezeichnet.

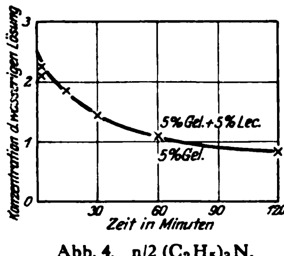


Abb. 4. n/2 $(C_2H_5)_3N$.

Adsorption und Osmose von Dipropylaminlösungen in ein 5proz. Gelatinegel mit und ohne Lecithinzusatz.

Tabelle VIII. n/15 $(C_3H_7)_2HN$.

Zeit	Ohne Lecithinzusatz		Mit 5 Proz. Lecithinzusatz	
	Volumen der Lösung	Anzahl ccm n/15 HCl	Volumen der Lösung	Anzahl ccm n/15 HCl
0′	30,0	2,50	30,0	2,50
3′	28,2	2,16	28,2	1,78
15′	26,1	1,80	26,5	1,50
30′	24,8	1,40	25,3	1,22
1h	23,2	1,11	24,1	0,93
2h	21,0	0,77	22,6	0,56
24h	12,2	0,11	14,6	0,06

Tabelle IX. n/30 $(C_3H_7)_2HN$.

Zeit	Ohne Lecithinzusatz		Mit 5 Proz. Lecithinzusatz	
	Volumen der Lösung	Anzahl ccm n/30 HCl	Volumen der Lösung	Anzahl ccm n/30 HCl
0′	30,0	2,50	30,0	2,50
3′	28,2	1,94	28,0	1,78
15′	26,2	1,50	26,2	1,50
30′	24,8	1,31	25,1	1,22
1h	23,4	0,94	24,0	0,93
2h	21,8	0,63	22,6	0,56
24h	14,0	0,12	15,7	0,06

Das Dipropylamin unterscheidet sich vom Diäthylamin wie auch Trimethylamin nicht nur durch seine größere Oberflächenaktivität, sondern auch durch seine geringere Löslichkeit in Wasser und dementsprechend auch größere Löslichkeit in Lipoiden. Demgemäß finden wir dann auch hier, namentlich für die konzentrierteren n/15 Lösungen, eine größere Adsorption und Osmose bei den lecithinhaltigen Gelen als bei den lecithinfreien Gelen.

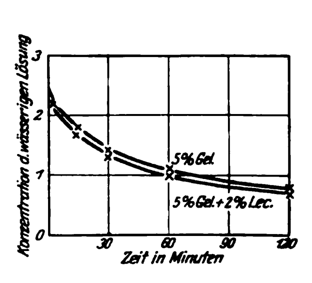


Abb. 5. n/15 $(C_3H_7)_2HN$.

Oberflächenaktive Stoffe (wie Diäthylamin, Trimethylamin) *bevorzugen den Wasserweg, sofern sie in Wasser erheblich löslich sind, während oberflächenaktive Stoffe* (wie Dipropylamin), *welche in Wasser schwer löslich sind, den Lipoidweg bevorzugen. Für die Geschwindigkeit der Adsorption und Osmose in ein lecithinfreies Gelatinegel ist die Oberflächenaktivität kein entscheidender Faktor.*

Tabelle X. 3 Proz. $C_6H_5NH_2$ (gesättigte Lösung).

Zeit	Ohne Lecithinzusatz		Mit 5 Proz. Lecithinzusatz	
	Volumen der Lösung	Tropfenzahl bei 18°	Volumen der Lösung	Tropfenzahl bei 18°
0′	30,0	37,0	30,0	37,0
3′	29,3	37,0	29,0	35,3
15′	28,8	35,0	28,4	34,2
30′	28,4	34,1	27,9	33,0
1h	27,8	33,0	27,2	31,9
2h	27,2	31,5	26,6	30,7
24h	23,6	30,0	22,5	29,5

Für das in Wasser ja auch schwer lösliche Anilin ergab sich dasselbe wie für Dipropylamin. Titrationen waren hier schlecht ausführbar. Konzentrationsbestimmungen wurden daher mit Hilfe des Stalagmometers ausgeführt. Wie die Arbeit von *Tomita*, l. c., zeigt, entziehen die Lösungen den Gelen oberflächenaktive Stoffe, und zwar den lecithinhaltigen Gelen ein Mehr solcher Stoffe, als den lecithinfreien Gelen. Daraus folgt, daß das Anilin den Lecithinweg gegenüber dem Wasserweg bevorzugt.

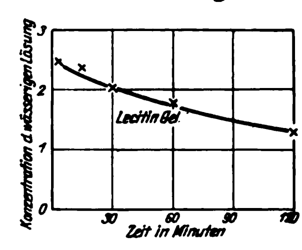


Abb. 6. n/11,4 $(CH_3)_3N$.

Um zu prüfen, mit welcher Geschwindigkeit ein oberflächenaktives Amin von reinem Lecithin aufgenommen wird, wurde eine dünne Lecithinschicht aus 1 g Lecithin hergestellt, welche gleichmäßig den Boden eines zylindrischen Schälchens von 6,7 cm Durchmesser bedeckte, und darauf goß man 15 ccm einer n/11,4 Trimethylaminlösung. Tabelle XI und Abb. 6 enthalten die Ergebnisse.

Tabelle XI. n/11,4 $(CH_3)_3N$.

Zeit	Volumen der Lösung	Anzahl ccm n/11,4 HCl	Zeit	Volumen der Lösung	Anzahl ccm n/11,4 HCl
0′	15,0	2,50	1h	13,9	1,77
3	14,4	2,50	2	13,6	1,31
15	14,3	2,39	24	12,6	0,39
30	14,2	2,05			

Auch hier fällt die Langsamkeit auf, mit welcher die Adsorption stattfindet.

Um die Oberflächenspannungen der untersuchten Lösungen vergleichen zu können, wurden in der folgenden Tabelle XII die bei 18° gemessenen stalagmometrischen Tropfenzahlen nebeneinandergestellt.

Tabelle XII.

H_2O	54,0	n/2 $(C_2H_5)_2HN$	80,0
n/5 KOH	54,0	n/2 $(C_2H_5)_3N$	113,5
n/5 $NaOH$	53,8	n/15 $(C_3H_7)_2HN$	90,5
n/5 NH_3	53,8	n/30 $(C_3H_7)_2HN$	74,0
n/5 $(CH_3)_3N$	67,8	n/60 $(C_3H_7)_2HN$	64,0
n/5 $(C_2H_5)_2HN$	69,0		

Endlich wurde die *Diffusionsgeschwindigkeit* einiger Lösungen im 3proz. Gelatinegel mit und ohne Lecithinzusatz ermittelt, indem in Reagenzgläsern gleiche Mengen der betreffenden Lösungen die mit geringen Mengen Neutralrot versetzten Gele überschichteten.

Tabelle XIII. n/5 NH_3, n/12 $(CH_3)_3N$, n/30 $(C_3H_7)_2HN$.

Zeit	Ohne Lecithinzusatz Geschwindigkeit in cm			Mit 2 Proz. Lecithinzusatz Geschwindigkeit in cm		
	n/5 NH_3	n/12 $(CH_3)_3N$	n/30 $(C_3H_7)_2HN$	n/5 NH_3	n/16 $(CH_3)_3N$	n/30 $(C_3H_7)_2HN$
0'	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
10	0,30	0,20	0,20	0,20	0,15	0,10
30	0,55	0,35	0,25	0,35	0,35	0,15
1h	0,80	0,51	0,30	0,55	0,50	0,30
2	1,10	0,72	0,40	0,80	0,65	0,40
3	1,30	0,85	0,50	—	—	—
22	3,20	2,45	1,30	2,90	2,10	1,30
24	3,38	2,60	1,40	—	—	—
46	4,30	3,50	1,90	4,10	3,00	1,90

Es ist bemerkenswert, daß die Diffusionsfähigkeit derjenigen Amine, wie NH_3 und $N(CH_3)_3$, in einem lecithinhaltigen Gel geringer ist als in einem lecithinfreien Gel, welche von einem lecithinfreien Gel besser aufgenommen werden als von einem lecithinhaltigen Gel (siehe weiter oben), während die größere Diffusionsfähigkeit des Dipropylamins in dem lecithinhaltigen Gel zusammenfällt mit der besseren Adsorption und Osmose dieses Amins in dem betreffenden Gel.

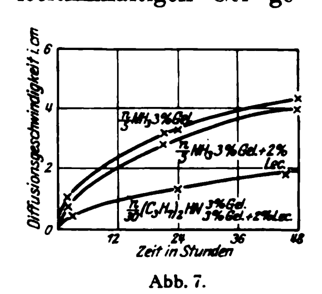


Abb. 7.

Schließlich wurde auch eine Reihe von *Quellungsversuchen* mit den betreffenden Lösungen und Gelen ausgeführt, indem die Wasseraufnahme von seiten der Gele mit der Zeit untersucht wurde.

Die Ergebnisse dieser Versuche sollen an anderer Stelle veröffentlicht werden.

Zusammenfassung.

Durch Überschichtung von Gelatinegelen ohne und mit Lecithinzusatz mit wässerigen Lösungen von Alkalien und insbesondere von Aminen wurde festgestellt, daß selbst Amine von großer Oberflächenaktivität (Diäthylamin, Trimethylamin) den Wasserweg bevorzugen, wenn sie in Wasser leicht löslich sind, während oberflächenaktive Amine von geringerer Wasserlöslichkeit (Dipropylamin, Anilin) den Lecithinweg bevorzugen. Diesem Verhalten entspricht auch die Diffusionsgeschwindigkeit der betreffenden Amine im lecithinfreien und lecithinhaltigen Gelatinegel.

Einfache Beziehungen zwischen Oberflächenaktivität und Adsorption wie Osmose sind bei den Aufnahmen der Amine in einem lipoidfreien Gelatinegel, entsprechend den früheren Mitteilungen von *Traube* und seinen Mitarbeitern nicht vorhanden.

Bemerkenswert ist die langsame Adsorption selbst oberflächenaktiver Amine in den Gelen.

Anmerkung von J. Traube. *R. E. Liesegang* hat in der Zsigmondy-Festschr. 1925, S. 82, vgl. auch *Liesegang*, Kolloidchem. **6**, 140, 1926, gegenüber den Schlüssen, welche ich aus den Arbeiten von *Tomita* und *Yumikura* zog, darauf hingewiesen, daß das Lecithin im Gelatinegel nur in Form von Tröpfchen enthalten sei, und wenn ein rascheres Eindringen von Caprylsäure bei Gegenwart von Lecithin beobachtet wurde, so könne dies auf Speicherungswirkung beruhen, wodurch das Konzentrationsgefälle gesteigert wird. Ich bin hierin ganz der Auffassung von *Liesegang*, aber ich verstehe nicht, weshalb meine Schlüsse falsch sein sollen. Die Versuche von *Tomita*, *Yumikura* und *Suganuma* scheinen mir deshalb so beachtenswert, weil sie zeigen, daß die in bezug auf die Permeabilität in Zellen beobachteten Beziehungen zwischen Oberflächenaktivität und Permeabilität bei den Adsorptionsvorgängen in Gelen erst dann sich geltend machen, wenn die wässerigen Gele aus Gelatine und Eiweiß Lipoide wie Lecithin enthalten. Ob hier eine Lecithinemulsion vorliegt oder eine Lösung, erscheint mir nebensächlich.

Synthese der α-Keto-d-gluconsäure.

Von

Carl Neuberg und Torao Kitasato.

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für Biochemie in Berlin-Dahlem.)

Der einfachste aliphatische Ketonaldehyd, das Methylglyoxal, läßt sich mit Bromwasser zu Brenztraubensäure in praktisch quantitativer Ausbeute oxydieren, wie vor zwei Jahren *C. Neuberg* und *G. Gorr*[1]) dargetan haben. Damit war auf rein chemischem Wege zum ersten Male eine Beziehung zwischen dem wichtigen Methylglyoxal und der nicht minder bedeutungsvollen Brenztraubensäure hergestellt. Die hierbei ausgesprochene Erwartung, daß auch die *Osone* sich auf analogem Wege *in die zugehörigen α-Ketosäuren der Zuckerreihe überführen* lassen würden, hat sich erfüllt.

20 g *d-Glucoson* in 1 Liter Wasser werden mit 20 g Brom in einer Glasstöpselflasche versetzt. Beim Umschütteln löst sich das Halogen schnell auf und wird beim Stehen im Licht in 3 bis 4 Tagen weitgehend verbraucht. Aus der gelb gefärbten Flüssigkeit wird alsdann durch einen Luftstrom überschüssiges Brom ausgetrieben und der gebildete Bromwasserstoff durch Neutralisation des farblos gewordenen Reaktionsproduktes mit alkalifreiem Bleicarbonat zum größten Teil entfernt. Die vom Bromblei und kohlensaurem Blei abfiltrierte Flüssigkeit wird mit Schwefelwasserstoff vom Metall und durch Einblasen von Kohlendioxyd von H_2S befreit. Durch Schütteln mit Calciumcarbonat und kurzes Aufkochen neutralisiert man darauf die stark saure Flüssigkeit. Sie wird nach Filtration im Vakuum auf 50 bis 100 ccm eingeengt, wobei zweckmäßig etwas Calciumcarbonat als Bodenkörper zugefügt wird. Die jetzt schwach gelblich gefärbte Flüssigkeit wird in 500 bis 800 ccm absoluten Alkohols unter starkem Rühren eingetropft. Dabei scheidet sich das Calciumsalz der α-Keto-d-gluconsäure in Flocken ab.

[1]) *C. Neuberg* und *G. Gorr*, diese Zeitschr. **166**, 442, 1925.



die nach einigem Stehen sich zusammenballen und abfiltriert werden. Durch Wiederauflösen in Wasser und Fällung mit Alkohol entfernt man anhaftende kleine Mengen von Calciumbromid. Mit zunehmender Reinigung fällt das Calcium-2-keto-gluconat schwieriger aus und wird wegen seiner feinflockigen Beschaffenheit am besten durch Abschleudern in festem Zustande abgeschieden sowie auf der Zentrifuge mit Alkohol gewaschen. Das so gewonnene *Calciumsalz* enthält Halogen höchstens in Spuren. Es bildet ein weißes, in Wasser spielend leicht lösliches Pulver. Ausbeute 18 g.

Löst man das Calciumsalz in Wasser, gibt einen kleinen Überschuß von Oxalsäure hinzu, filtriert und schüttelt mit reinem Bariumcarbonat, so entsteht eine Lösung des Bariumsalzes, das man nach dem Einengen in vacuo mit Alkohol oder noch besser mit Aceton ausfällen kann.

Das *Bariumsalz der α-Keto-gluconsäure* bildet ebenfalls ein weißes, in Wasser leicht lösliches Pulver. Nach dem Trocknen im Vakuum bei 67° hat das Salz schon den richtigen Bariumgehalt.

$(C_6H_9O_7)_2Ba$. Ber.: 26,24 Proz. Ba. Gef.: 26,11 und 26,34 Proz. Ba.

Da weder das Calciumsalz noch Bariumsalz kristallisierte, so haben wir das Calciumsalz in das schön und leicht kristallisierende *Brucinsalz* übergeführt. Zu diesem Zwecke wurde aus dem Calciumsalz das Erdalkali mit der berechneten Menge Oxalsäure ausgefällt, die Flüssigkeit mit einem kleinen Überschuß von Brucin versetzt und 15 Minuten lang erwärmt. Nach dem Erkalten wurde filtriert, in Lösung befindliches freies Alkaloid mit Chloroform ausgeschüttelt und die wässerige Flüssigkeit im Vakuum konzentriert. Schon beim Einengen kristallisierte das Brucinsalz, und schließlich erstarrte die ganze Flüssigkeit zu einem Brei kleiner Nadeln. Dieselben wurden aus 85proz. Alkohol unter Zusatz von etwas Knochenkohle fünfmal umkristallisiert. Das nunmehr farblose Brucinsalz hatte den Schmelzpunkt von 171° (unter Zersetzung). Die spezifische Drehung des 8 Tage im Hochvakuum über P_2O_5 getrockneten Salzes war in Wasser $[\alpha]_D = -50{,}8^0$ ($\alpha = -1{,}49^0$; $l = 2$; $c = 1{,}467$; $t = 20^0$).

In 50proz. Alkohol war $[\alpha]_D = -42{,}7^0$ ($\alpha = -1{,}24^0$; $l = 2$, $c = 1{,}453$; $t = 22^0$).

0,1907 g Substanz: 7,9 ccm N (21,5°, 751 mm).
0,1633 g „ 0,3517 g CO_2 und 0,0855 g H_2O.
$C_{23}H_{26}O_4N_2 \cdot C_6H_{10}O_7$. Ber.: C = 59,15; H = 6,15; N = 4,76 Proz.
Gef.: C = 58,74; H = 5,83; N = 4,75 „ .

Aus dem Brucinsalz läßt sich durch Behandeln mit kalter halb gesättigter Barytlösung das *Bariumsalz regenerieren und ganz rein*

gewinnen. Zu diesem Zwecke wurden 3 g Brucinsalz in 150 ccm Wasser mit einem kleinen Überschuß von Barytwasser unter Eiskühlung versetzt. Zur Vermeidung der Ausfällung eines basischen Bariumsalzes (siehe unten) leitet man sofort Kohlendioxyd ein und filtriert die damit gesättigte Lösung, wodurch Bariumcarbonat und auskristallisiertes Brucin entfernt werden. Der Flüssigkeit entzieht man den in Lösung gebliebenen Anteil des Alkaloids mittels Chloroform.

Die wässerige Lösung des Bariumsalzes wird im Vakuum auf 10 ccm eingeengt und mit Aceton gefällt. Das jetzt in groben Flocken ausgeschiedene Bariumsalz läßt sich leicht abfiltrieren. Es wird einmal umgefällt und hat nach dem Trocknen im Hochvakuum bei 67° die richtige Zusammensetzung $(C_6H_9O_7)_2Ba$.

0,1561 g Substanz: 0,0681 g $BaSO_4$.
0,1566 g „ 0,1600 g CO_2 und 0,0517 g H_2O.

$(C_6H_9O_7)_2Ba$.	Ber.:	Ba = 26,24;	C = 27,50;	H = 3,46 Proz.
	Gef.:	Ba = 25,67;	C = 27,86;	H = 3,69 „ .

Die wässerige Lösung des Salzes reduziert intensiv alkalische Kupfermischung, und zwar auch langsam schon in der Kälte. Mit Barytwasser[1]), Strontiumhydroxyd und Bleiessig enstehen, namentlich in der Wärme, schwerlösliche Verbindungen. Die Verbindung liefert eine nicht übermäßig starke Orcinreaktion. Die spezifische Drehung der freien Säure ergibt sich in einer mit der äquivalenten Menge Salzsäure versetzten Lösung des regenerierten Bariumsalzes (0,2322 g + 0,89 ccm n HCl aufgefüllt mit H_2O auf 10,0 ccm) zu − 75,5°. ($\alpha = -2{,}60°$; $l = 2$, $t = 23°$).

Die Säure bildet, wie erwähnt, ein äußerst leicht lösliches normales Salz mit Calcium und mit den übrigen Erdalkalien. Hierdurch wie durch die abweichende spezifische Drehung erweist sich unsere Säure als sicherlich verschieden von der am längsten bekannten Ketogluconsäure von *Boutroux*, der nach den Untersuchungen von *G. Bertrand*[2]) sowie *H. Kiliani*[3]) wahrscheinlich die Formel der 5-Keto-gluconsäure zukommt. Trotz kleiner Differenzen in den physikalischen Konstanten halten wir unsere Substanz für identisch mit der Verbindung, die auf einem Umwege (aus Fructose über ihr β-Diacetonid, dessen Oxydation und Abspaltung von Aceton) *Ohle*[4])

[1]) *O. Schmiedeberg* und *H. H. Meyer*, H. **3**, 422, 1879.
[2]) *G. Bertrand*, Ann. chim. et phys. [8] **3**, 284, 1904.
[3]) *H. Kiliani*, Ber. **55**, 2820, 1922.
[4]) *H. Ohle*, ebendaselbst **58**, 2577, 1925.

dargestellt hat. Unsere Säure, die weit von der gleichfalls als α-Keto-gluconsäure ausgesprochenen Säure von *Hönig* und *Tempus*[1]) abweicht, ist jedenfalls eindeutig als 2-Keto-d-gluconsäure charakterisiert.

Die noch weitergehende Untersuchung der Substanz nebst der Ausdehnung des neuen Verfahrens auf die analoge Gewinnung anderer α-Ketosäuren der Zuckerreihe möchten wir uns vorbehalten. Hierüber wie über eine einfache Art der Darstellung von Osonen soll gleichfalls später berichtet werden.

[1]) *M. Hönig* und *F. Tempus*, Ber. 57, 2787, 1924.

Autorenverzeichnis.

